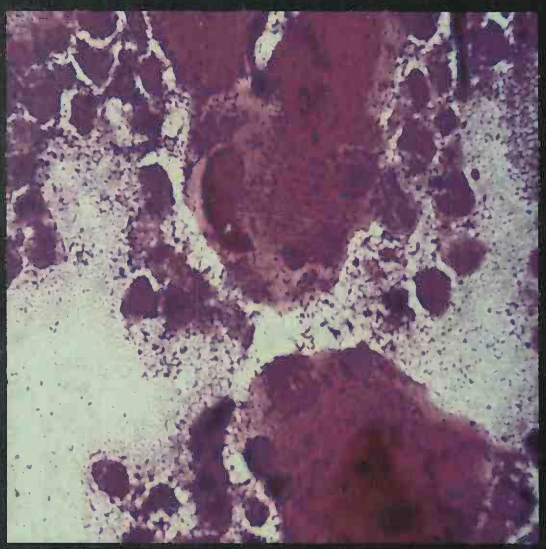
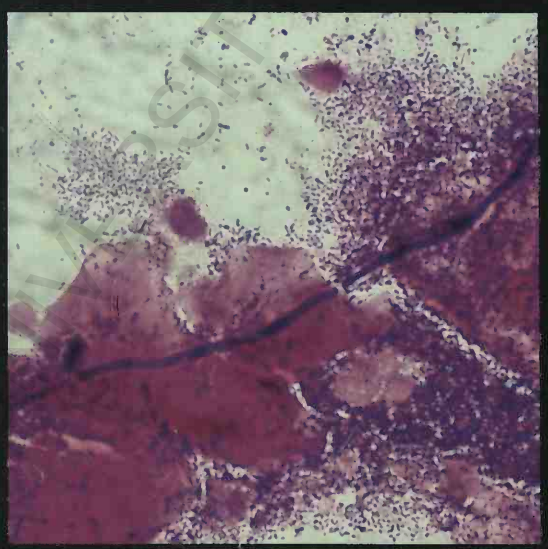
Mariana Carmen Chifiriuc Grigore Mihăescu Veronica Lazăr

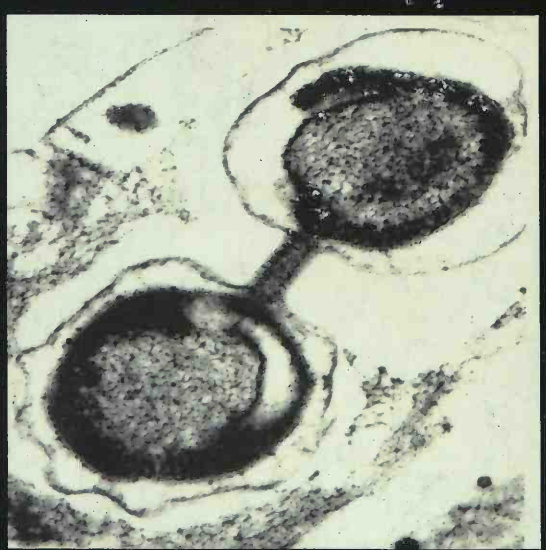
MICROBIOLOGIE ȘI VIROLOGIE MEDICALĂ

Ediția a doua

Vol. I







editura universității din bucurești

CARMEN CHIFIRIUC GR. MIHAESCU VERONICA LAZAR

MICROBIOLOGIE SI VIROLOGIE MEDICALA

EDIŢIA A DOUA

VOL. I

UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

Cuvânt înainte .....

PARTEA I. BACTERIOLOGIE MEDICALĂ 13

INTRODUCERE 13

1. SCURT ISTORIC AL MICROBIOLOGIEI MEDICALE 14

2. STRUCTURA şi FUNCŢIILE CELULEI BACTERIENE 20

2.1. Peretele celular 20

2.1.1. Structura moleculară a peretelui celular la bacteriile Gram pozitive 21

2.1.2. Peretele celular la bacteriile Gram negative 24

2.1.3. Peretele celular la Archaea 24

2.1.3.1. Structura chimică a moleculei de LPS 26

2.1.3.2. Spaţiul periplasmic 27

2.1.4. Peretele celular acido-rezistent al micobacteriilor 28

2.1.5. Funcţiile peretelui celular 28

2.1.6. Protoplaştii 29

2.2. Membrana plasmatică 30

2.2.1. Structura membrane plasmatice 30

2.2.2. Funcţiile membranei plasmatice 34

2.2.3. Mecanismele fiziologice ale permeabilităţii membranei 34

2.3. Mezosomul 35

2.4. Citoplasma 36

2.5. Nucleoidul bacterian 37

2.54.1. Organizarea fizică a cromosomului 37

2.6. Ribosomii 39

2.6.1. Particularităţile sintezei proteinelor la bacterii 40

2.6.2. Secreţia proteinelor extracelulare la bacterii 41

2.7. Sporul 43

2.7.1. Structura internă a endosporului 45

2.7.2. Particularităţile biochimice ale sporului 45

2.8. Incluziile 46

2.9. Glicocalixul 47

2.9.1. Capsula 47

2.9.1.1. Natura chimică a materialului capsular 48

2.9.2. Glicocalixul comportamental 49

2.10. Flagelul 51

2.10.1. Structura flagelului 51

2.10.2. Motilitatea şi chimiotaxia 52

2.11. Fimbriile 52

2.12. Pilii 54

2.13. Dinamica unei culturi bacteriene discontinui 54

2.14. Metabolismul bacterian 58

2.14.1. Particularităţile generale ale metabolismului bacterian 58

2.14.2. Metabolismul energetic bacterian 59

2.14.3. Tipuri de metabolism energetic in funcţie de acceptorul final de electroni 59

2.14.3.1. Respiraţia aerobă bacteriană 61

2.14.3.2. Respiraţia anaerobă 63

2.14.3.3. Fermentaţia 64

2.14.4. Catabolismul lipidelor 68

2.14.5. Catabolizarea compuşilor organici cu azot 68

2.14.6. Catabolismul compuşilor aromatici 69

BCU "IOAN CENTRAL" UNIVERSITY LIBRARY

3. **MICROBIOTA NORMALĂ A ORGANISMULUI UMAN** 71
3.1. Colonizarea şi succesiunea microorganismelor la om 72
3.2. Microbiota normală a tractului respirator şi a cavităţii orale 73
3.2.1. Implicaţiile microbiotei orale în patologia dentară 75
3.3. Habitatele microbiotei gastrointestinale 80
3.4. Microbiota normală a tractului urogenital 83
3.5. Microbiota normală a pielii 84
3.6. Microorganismele probiotice 84
3.7. Gnotobioza şi animalele gnotobiotice 85
3.7.1. Caracteristicile animalelor "*germ-free*" 85
3.8. Rolurile microbiotei normale 86
4. **PROPRIETĂŢILE MICROORGANISMELOR PATOGENE: PATOGENITATEA ŞI VIRULENŢA BACTERIANĂ** 88
4.1. Definiţii 88
4.2. Infecţiozitatea 90
4.2.1. Adezinele bacteriene 90
4.2.2. Biofilmele microbiene 94
4.3. Sideroforii – factori de virulenţă 99
4.4. Agresivitatea (Invazivitatea) 103
4.5. Toxigenitatea 106
4.6. Proprietăţi metabolice particulare implicate în virulenţa bacteriană 123
4.7. Reglarea expresiei factorilor de virulenţă 126
4.8. Evoluţia bacteriilor patogene 127
4.9. Relaţia dintre patogenitate şi parazitism 128
4.10. Microorganismele oportuniste 129
5. **EVOLUŢIA PROCESULUI INFECŢIOS** 130
5.1. Etapele procesului infecţios 130
5.2. Condiţiile de apariţie a procesului infecţios 141
5.3. Modalităţi de evoluţie a procesului infecţios 144
6. **COCI PIOGENI DE IMPORTANŢĂ MEDICALĂ** 147
6.1. Coci Gram pozitivi, catalază pozitivi, aerobi de importanţă medicală. Familia *Micrococcaceae* 147
6.1.1. Genul *Staphylococcus* 147
6.2. Coci Gram pozitivi, catalazănegativi, de importanţă medicală. Familia *Streptococcaceae* 162
6.2.1. *Streptococcus pyogenes* 163
6.2.2. *Streptococcus agalactiae* 168
6.2.3. *Streptococii de grup C şi G* 169
6.2.4. *Streptococcus pneumoniae* 169
6.2.5. Genul *Enterococcus* 172
6.2.6. Alte genuri şi specii de streptococi 176
6.2.7. Diagnosticul bacteriologic al infecţiilor streptococice 177
6.3. Coci piogeni Gram negativi de importanţă medicală – Familia *Neisseriaceae* 180
6.3.1. Genul *Neisseria* 180
6.3.1.1. *Neisseria gonorrhoeae* 182
6.3.1.2. *N. meningitidis* 185
6.3.1.3. *Alte specii de Neisseria* 186
6.3.2. *Moraxella catarrhalis* 187
6.3.3. *Kingella denitrificans* 187
7. **BACILI GRAM NEGATIVI DE IMPORTANŢĂ MEDICALĂ** 189
7.1. Familia *Enterobacteriaceae* 189
7.1.1. Genul *Escherichia* 191
7.1.2. Genul *Salmonella* 199
7.1.3. Genul *Shigella* 206
7.1.4. *Citrobacter freundii* 211
7.1.5. Grupul *Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Serratia* (KEHS) 211
7.1.6. Grupul *Proteus Morganella Providencia* 212
7.1.7. Genul *Edwardsiella* 214
7.1.8. Genul *Levinea (Citrobacter) malonatica* 214
7.1.9. Genul *Kluyvera* 214
7.1.10. Genul *Buttiauxella* 214
7.1.11. Genul *Yersinia* 215

BCU TIMIŞOARA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7.2. **Bacili Gram negativi nonfermentativi opportunisti** 219
7.2.1. *Pseudomonas aeruginosa* 220
7.2.2. *Ps. Mallei* 226
7.2.3. *Ps. (Burkholderia) pseudomallei* 226
7.2.4. *Burkholderia cepacia* 226
7.2.5. *Stenotrophomonas maltophilia* 228
7.2.6. Genul *Acinetobacter* 228
7.2.7. Alte specii de bacili Gram negativi 230
7.3. **Familia *Pasteurellaceae*** 233
7.3.1. Genul *Pasteurella* 233
7.3.2. Genul *Haemophylus* 234
7.4. ***Bordetella pertussis*** 237
7.5. **Genul *Brucella*** 240
7.6. ***Francisella tularensis*** 241
7.7. ***Legionella*** 244
8. **BACILI GRAM POZITIVI SPORULAȚI. FAMILIA *BACILLACEAE*** 248
8.1. ***Bacillus anthracis*** 249
8.2. ***B. cereus*** 250
8.3. **Genul *Clostridium*** 251
9. **BACILI GRAM POZITIVI NESPORULAȚI** 262
9.1. Genul *Corynebacterium* 262
9.2. Genul *Listeria* 265
9.3. *Erysipelothrix rusiopathiae* 270
10. **ACTINOBACTERII** 271
10.1. ***Nocardia asteroides*** 271
10.2. **Genul *Mycobacterium*** 272
11. **INFECȚII PRODUSE DE BACTERII ANAEROBE REZIDENTE ÎN MICROBIOTA NORMALĂ** 281
12. **BACTERII SPIRALATE DE IMPORTANȚĂ MEDICALĂ** 285
12.1. **Vibrioni. Familia *Vibrionaceae*** 285
12.1.1. Genul *Vibrio* 285
12. 1.2. Genul *Aeromonas* 292
12.1.3. Genul *Photobacterium* 294
12.2. **Spirili** 294
12.2.1. *Campylobacterii* 294
12.2.2. Familia *Helicobacteriaceae* 298
12.3. **Spirochete** 302
12.3.1. *Borrelia* 303
12.3.2. *Treponema* 306
12.3.3. *Leptospira* 310
13. **BACTERII STRICT INTRACELULARE** 315
13.1. ***Chlamidii*** 317
13.2. ***Ricketsii*** 321
13.3. ***Coxiella burnetii*** 322
13.4. **Genul *Ehrlichia*** 323
14. **MICOPLASME** 324
15. **DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECȚIILOR MICROBIENE** 328
15.1. **Noțiuni de asigurarea calității în bacteriologia clinică** 328
15.2. **Tipuri de produse patologice recoltate în scopul unei analize microbiologice** 348
15.3. **Analiza bacteriologică a probelor din tractul respirator** 352
15.4. **Analiza bacteriologică a probelor din tractul respirator inferior** 355
15.5. **Examenul citobacteriologic al urinii (ECU)** 357
15.6. **Examenul bacteriologic al secrețiilor și exsudatelor ano-genitale** 360
15.7. **Diagnosticul bacteriologic al materiilor fecale. Coprocultura** 363
15.8. **Hemocultura** 367
15.9. **Examenul bacteriologic al dispozitivelor intravasculare (catetere, camere implantabile)** .. 372
15.10. **Examenul citochimic și bacteriologic al lichidului cefalorahidian** 373
15.11. **Examenul bacteriologic al lichidelor de puncție (lichide purulente, serozități)** 376
15.12. **Analiza microbiologică a exsudatelor purulente, a secrețiilor de plagă și a abceselor** 377
15.13. **Examenul bacteriologic al lichidului de dren** 379
15.14. **Examenul bacteriologic al prelevatelor oculare** 379

PUMF "NICOLAE TESTEMIȚANU" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

15.15. Examenul bacteriologic al prelevatelor perinatale 381
15.16. Izolarea şi identificarea bacteriilor anaerobe 382
15.17. Diagnosticul infecţiilor cu micobacterii 384
15.18. Evidenţierea potenţialului de patogenitate şi virulenţă prin teste *in vitro* 388
16. TERAPIA ANTIMICROBIANĂ 395

PARTEA A II-A. VIROLOGIE MEDICALĂ
17. NOŢIUNI INTRODUCTIVE 432
17.1. Modelul general de structură a virionului 433
17.1.1. Capsida 434
17.1.2. Învelişul viral (peplosul) 434
17.1.3. Genomul viral. Organizarea fizică 435
17.1.4. Genomuri virale ARN segmentate 437
17.1.5. Modalităţi particulare de codificare a informaţiei genetice la virusuri 437
17.1.6. Infecţiozitatea acizilor nucleici 440
17.2. Definirea conceptului modern de virus 440
17.3. Natura virusurilor 441
17.4. Simetria virusurilor 443
17.4.1. Simetria helicală 444
17.4.2. Simetria icozaedrică 444
17.4.3. Probleme legate de modul de construcţie a virionilor icozaedrici 445
17.4.4. Simetria binară 446
18. MULTIPLICAREA VIRUSURILOR 447
18.1. Iniţierea procesului infecţios 449
18.2. Pătrunderea virusului în celulă (infecţia propriu-zisă) 450
18.3. Sinteza ARNm viral 453
18.3.1. Sinteza ARNm la dezoxiribovirusuri 454
18.3.2. Originea ARNm la ribovirusuri 455
18.4. Biosinteza proteinelor virale timpurii 457
18.5. Replicarea genomului viral ADN 457
18.6. Replicarea şi transcrierea genomului viral ARN 461
18.6.1. Replicarea şi transcrierea ARN printr-un intermediar ADN 463
18.7. Biosinteza proteinelor tardive 464
18.7.1. Transportul şi prelucrarea proteinelor 465
18.8. Asamblarea (morfogeneza) şi eliberarea virionilor 464
19. TIPURI DE RELAŢII VIRUS-CELULĂ 469
19.1. Patologia celulelor infectate cu virusuri 470
19.2. Mecanismele moleculare ale efectului citopatic 471
19.2.1. Modificări metabolice 471
19.2.1.1. Modificări ale metabolismului acizilor nucleici celulari 472
19.2.1.2. Modificări ale metabolismului proteinelor celulare 473
19.2.2. Pierderea funcţiilor membranelor celulare 474
19.2.3. Modificări ale citoscheletului 475
19.2.4. Apoptoza 475
19.2.5. Apariţia corpilor de incluzie 476
20. RELAŢII DINTRE VIRUSURI ŞI ORGANISME 477
20.1. Căile de intrare a virusurilor 477
20.2. Tropismul viral 479
20.2.1. Neurotropismul 479
20.2.2. Enterotropismul 481
20.3. Tipuri de infecţii *in vivo* 482
20.3.1. Persistenţa virală 483
20.3.2. Mecanismele persistenţei virale 484
20.3.3. Importanţa infecţiilor persistente 485
21. FAMILII DE VIRUSURI CU SEMNIFICAŢIE CLINICĂ 487
21.1. Familia *Orthomyxoviridae* 487
21.2. Familia *Paramyxoviridae* 498
21.3. Familia *Rhabdoviridae* 507
21.4. Familia *Filoviridae* 513
21.5. Familia *Picornaviridae* 514
21.6. Arbovirusuri. Familia *Flaviviridae* 524

ROMANIAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

21.7. Familia *Asfarviridae* 534
21.8. Familia *Togaviridae* 535
21.9. Familia *Bunyaviridae* 538
21.10. Familia *Arenaviridae* 540
21.11. Familia *Coronaviridae* 543
21.12. Familia *Reoviridae* 546
21.13. Familia *Adenoviridae* 551
21.14. Familia *Herpesviridae* 558
21.15. Familia *Parvoviridae* 573
21.16. Familia *Poxviridae* 579
21.17. Familia *Hepadnaviridae* 584
21.18. Familia *Retraviridae* 593
21.19. *Mimivirus* 612
22. RĂSPUNSUL IMUN ANTIVIRAL 614
22.1. Mecanisme nespecifice (înnăscute) de protecție antivirală 614
22.1.1. Imunitatea nespecifică mediată celular 614
22.1.2. Interferonii și mecanismele acțiunii lor 615
22.2. Răspunsul imun antiviral specific (adaptativ) 622
22.2.1. Imunitatea mediată humoral 623
22.2.2. Protecția antivirală a mucoaselor 625
22.2.3. Imunitatea mediată celular 626
22.2.4. Mecanisme prin care virusurile evită efectorii răspunsului imun 628
22.2.4.1. Toleranța și/ sau diminuarea reactivității imunitare 629
22.2.3.2. Variația antigenică 630
23. NOȚIUNI GENERALE DE ONCOGENEZĂ 632
23.1. Agenții fizici și chimici ai malignizării 633
23.2. Etapele procesului de malignizare 634
23.3. Caracterele generale ale celulelor normale 635
23.4. Particularitățile funcționale ale celulelor maligne 637
23.5. Oncogenele celulare 641
23.6. Oncogeneza virală 644
23.7. Retravirusuri oncogene transductoare și netransductoare 646
23.6.1. Oncogenele virusurilor transductoare 646
23.6.2. Mecanismele oncogenezei cu retravirusuri 648
23.8. Dezoxiribovirusuri oncogene 651
23.8.1. Transformarea cu poliomavirusuri 653
23.8.2. Transformarea cu papilomavirusuri 656
23.8.3. Transformarea cu adenovirusuri 661
23.8.4. Transformarea cu herpesvirusuri 662
23.8.5. Transformarea cu virusul hepatitei B 663
24. AGENȚI INFECȚIOȘI SUBVIRALI 665
24.1. Virusul hepatitei D 665
24.1.1. Proteine codificate de virus 666
24.2. Viroizii 667
24.2.1. Patogenitatea viroizilor 669
24.3. Virusoizii 670
24.4. Virino 671
24.5. Prionii 671
24.5.1. Proteina neuronală PrP^c 672
24.5.2. Originea și apariția prionilor 673
24.5.3.Transmiterea experimentală a prionilor 675
24.5.4. Patogenitatea prionilor 675
25. VACCINURI VIRALE 678
25.1. Metode de atenuare a virulenței 678
25.2. Vaccinuri inactivate 679
25.3. Vaccinuri subunitare 680
25.3.1. Tehnici moderne de obținere a vaccinurilor subunitare 680
26. METODE DE STUDIU ȘI DE DIAGNOSTIC VIRAL 684
26.1. Metode directe 684
26.1.1. Metode microscopice 684
26.1.2. Metode de cultivare a virusurilor 685

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI
BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

26.2. Metode indirecte 687
26.2.1. Metode serologice 687
26.2.1.1. Evidențierea anticorpilor 687
26.2.1.2. Evidențierea antigenelor virale 689
26.2.2. Metode moleculare. Detectarea acizilor nucleici 690
26.3. Cuantificarea multiplicării virale 693
26.4. Purificarea şi identificarea virusurilor 693
26.5. Acțiunea factorilor fizici şi chimici asupra virusurilor 694
27. CHIMIOTERAPIA INFECȚIILOR VIRALE 696
27.1. Analogii nucleozidelor 697
27.2. Amine ciclice 701
27.3. Inhibitori ai sintezei proteinelor: β-thiosemicarbazone 701
27.4. Foscarnet 702
27.5. Chimioterapia infecției cu HIV 702
27.6. Imunoterapia 705
27.7. Rezistența virală la agenții chimioterapeutici 706

PARTEA A III-A. MICOLOGIE MEDICALĂ
28. NOȚIUNI INTRODUCTIVE DE MICOLOGIE 710
28.1. Caracterizarea generală a regnului Fungi 710
28.2. Tipuri de infecții fungice 714
28.3. Fungi patogeni la om 715
28.3.1. Dermatomicete 715
28.3.1.1. Agenți etiologici ai micozelor cutanate 715
Microsporum sp.
Trichophyton sp.
Epidermophyton sp.
28.3.1.2. Agenți etiologici ai micozelor subcutanate 724
Sporothrix schenckii
Madura sp.
Madurella sp.
Nattrassia mangiferae
Alternaria sp.
Bipolaris sp.
Exserohilum sp.
Cladophialophora carrionii
Fonsecaea sp.
Curvularia sp.
Exophiala sp.
Phialophora verrucosa
Scedosporium sp.
28.3.2. Agenți etiologici ai micozelor sistemice primare 725
Histoplasma capsulatum
Coccidioides immitis
Paracoccidioides brasiliensis
Blastomyces dermatitidis
28.3.3. Agenți etiologici ai micozelor oportuniste 728
Candida sp.
Cryptococcus neoformans
Pneumocystis jiroveci (*Pn. carinii*)
Aspergillus
Acremonium
Geotrichum candidum
Onychocola canadensisi
Scopulariopsis
Paecilomyces
Penicillium
Trichoderma viride
Zigomicoze (mucormicoze)
28.4. Terapia infecțiilor fungice 737
Prescurtări 745

RCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cuvânt înainte

Infecţiile virale, bacteriene şi fungice, în special cele cu transmitere aeriană, hidrică sau prin alimente de origine vegetală şi animală contaminate, înregistrează o frecvenţă din ce în ce mai mare, îndeosebi în marile aglomerări urbane.

Microbiologia medicală, în pofida denumirii, nu este un domeniu de activitate care aparţine exclusiv medicilor, deoarece la demersul actului medical participă, cu sarcini din ce în ce mai complexe, personalul laboratorului de microbiologie, care de regulă are o pregătire în domeniul ştiinţelor biologice.

În Facultatea de Biologie a Universităţii Bucureşti, disciplinele de profil bio-medical sunt reprezentate de Microbiologia medicală, Imunologie clinică şi Virologie, care se bucură de audienţă şi aprecieri favorabile din partea cursanţilor.

Microbiologie şi Virologie medicală este primul manual de profil bio-medical care apare în Universitatea Bucureşti şi după cunoştiinţa noastră, disciplina de Microbiologie-Imunologie-Virologie a Facultăţii de Biologie din Bucureşti este prima instituţie de profil din ţară care şi-a propus şi a realizat acest deziderat. Ciclurile de masterat ale facultăţii noastre sunt frecventate şi de absolvenţi ai altor universităţi, ale căror programe nu cuprind discipline de profil bio-medical, ceea ce sporeşte interesul şi atractivitatea pentru prelegerile noastre.

Manualul de *Microbiologie şi Virologie medicală* are o abordare biologică a conţinutului şi a modului de prezentare a materialului ştiinţific, adecvat şi adaptat pregătirii de bază. Autorii au fost preocupaţi, preponderent, de descrierea particularităţilor structurale şi funcţionale ale agenţilor infecţioşi (virusuri, bacterii, fungi) şi corelarea acestora cu mecanismele patogenităţii şi patologia specifică.

Manualul de *Microbiologie şi Virologie medicală*, bogat ilustrat color şi extins pe 748 pagini, se adresează, în primul rând studenţilor Facultăţii de Biologie, care audiază cursuri de profil, dar în egală măsură, biologilor şi medicilor cu specializare în microbiologia clinică. În egală măsură, manualul este accesibil şi necesar oricărui student al facultăţii noastre, deoarece noţiunile specifice de profil bio-medical sunt precedate de prezentarea celor fundamentale, cu scopul de a integra într-un tot unitar şi de a accentua relaţia directă dintre structură, funcţie şi mecanismele patogenităţii agenţilor infecţioşi, precum şi dinamica răspunsului imun.

Manualul de *Microbiologie şi Virologie medicală* cuprinde un capitol special, care constituie un adevărat ghid de bună practică pentru laboratorul clinic de *Bacteriologie*, elaborat în acord cu standardele internaţionale curente.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PARTEA I. BACTERIOLOGIE MEDICALĂ

INTRODUCERE

Microbiologia medicală este o ramură a Microbiologiei generale, care se ocupă cu studiul microorganismelor patogene. Acestea reprezintă doar o mică parte, cca. 550 de specii, din totalitatea microorganismelor, care constituie cca. ½ din biomasa Terrei aflndu-se la începutul şi la sfârşitul lanţurilor trofice. Microorganismele patogene sunt dotate cu capacitatea de a iniţia un proces infecţios, atunci când se îndeplinesc anumite condiţii:

1. un număr corespunzător de microorganisme;
2. poartă adecvată de intrare în organismul gazdă;
3. receptivitatea organismului gazdă;
4. condiţia fiziologică şi imunologică a gazdei.

Microbiologia medicală integrează domeniile Imunologiei, Bacteriologiei, Virologiei şi Parazitologiei, fiecare cu un nivel considerabil de dezvoltare independentă. Liantul acestor domenii este identificarea agenţilor etiologici ai maladiilor infecţioase, precum şi a mecanismelor reacţiilor imunitare ale gazdei.

Deşi antibioticele şi vaccinurile au eradicat, au eliminat sau au limitat multe maladii infecţioase, ameninţarea acestora rămâne, datorită emergenţei unor noi agenţi patogeni, selectaţi dintre agenţii oportunişti, evoluând pe terenul favorabil al unor gazde imunodeprimate din multiple cauze, sau al unor tulpini cu nivel înalt de rezistenţă la antibiotice, care generează mari dificultăţi terapeutice, uneori insurmontabile. Unei serii de boli cronice (scleroza în plăci, diabetul insulino-dependent, sindromul oboselii cronice, rectocolită hemoragică, encefalite, meningite, boala Wipple, sindromul Guillain-Barré) i se atribuie astăzi o etiologie infecţioasă. Unele maladii infecţioase (SIDA, rabia) rămân în prezent încă incurabile.

Schimbările globale au influenţat, de asemenea, arealul de răspândire al anumitor agenţi patogeni, în timp ce patogenii animali şi-au pierdut specificitatea de specie şi au infectat omul, adaptându-se la noua gazdă şi generând astfel fenotipuri adaptate speciei umane.

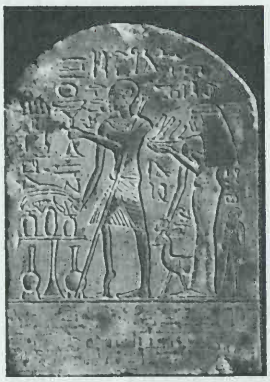
În prezent, principalele cauze de mortalitate şi morbiditate la nivel global sunt: boala diareică acută (3,3 milioane cazuri); bolile respiratorii acute (4,4 milioane decese anual); tuberculoza (1,7 milioane cazuri noi şi până la 3 milioane decese anual); SIDA, hepatitele virale, rujeola (1 milion decese anual).

Scopul acestui manual este de a prezenta noţiunile de bază despre agenţii patogeni care produc infecţii, mecanismele moleculare ale virulenţei specifice, mecanismele imunităţii antiinfecţioase, precum şi modalităţile de diagnostic de laborator al infecţiilor bacteriene şi fungice.

Cartea se adresează, în primul rând, studenţilor Facultăţii de Biologie, masteranzilor, precum şi biologilor,biochimiştilor, chimiştilor şi medicilor care lucrează în laboratoarele şi instituţiile de profil biomedical.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1. SCURT ISTORIC AL MICROBIOLOGIEI MEDICALE



Basorelief egiptean reprezentând un personaj cu sechele de poliomielită.

Bolile infecţioase (definite astăzi prin evoluţie rapidă, posibilitatea de propagare de la un organism la altul, indice mare de morbiditate şi mortalitate) au fost cunoscute încă din Antichitate (pe un basorelief egiptean, apare un personaj masculin care prezintă sechele de poliomelită).

Istoricii medicinii afirmă chiar că fiecare epocă este caracterizată de o maladie infecţioasă definitorie: lepra, pentru Antichitate, ciuma, în Evul Mediu, sifilisul în perioada Romantismului, bolile cronice în epoca actuală.

Ipotezele asupra originii infecţioase a unor maladii sunt foarte vechi. Există dovezi conform cărora pentru a alege locurile unde să se contruiască spitalele, Avicenna, un medic al antichităţii, atârna în diferite locuri bucăţi de carne crudă, aşteptând să vadă unde se alterează cel mai greu. Hypocrates (400 î.Hr.) este cel care afirmă că la geneza bolilor participă două tipuri de factori: intrinseci (constituţia bolnavului) şi extrinseci (alte elemente de natură nocivă), concepţie care a stat la baza teoriei miasmelor (grec: *miasma* = murdărie, emanaţie putridă), formulată de către Varon (100 î.Hr.), teorie conform căreia bolile sunt cauzate de animale foarte mici, invizibile, care pătrund prin gură şi nări. Aristotel (sec. 3 î.e.n.) observă că organismele vii se pot dezvolta pe materiale inerte.

Avicenna (sec. 11 î. Ch.).

Hipocrate.

Marcus Terentius Varro.

Aristotel (sec. 4 î.ch.).

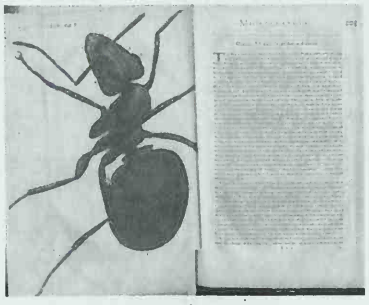
Fracastorius.

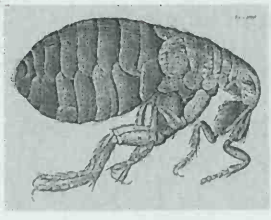
Hieronymus Fracastorius (1546) denumeşte *contagium vivum,* agentul sifilisului sau „seminaria morbi" şi menţionează pentru prima dată implicarea obiectelor inanimate în transmiterea bolilor epidemice.

În aceeaşi perioadă, lui Hans Zaccharias Janssen (sau Sacharias Jansen) i se atribuie primele invenţii care aveau să stea la baza microscopului. Robert Hooke (sec. 16) realizează primele desene ale unor materiale biologice observate la microscop, publicate în lucrarea *Micrographia.*

Hans Zaccharias Jansen.

Portretul lui Robert Hooke.



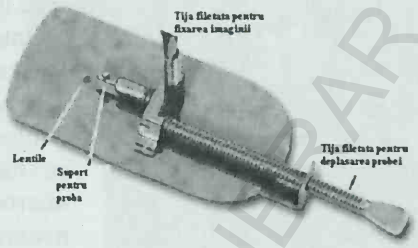


Pagini şi desene din *Micrographia* lui R. Hooke.

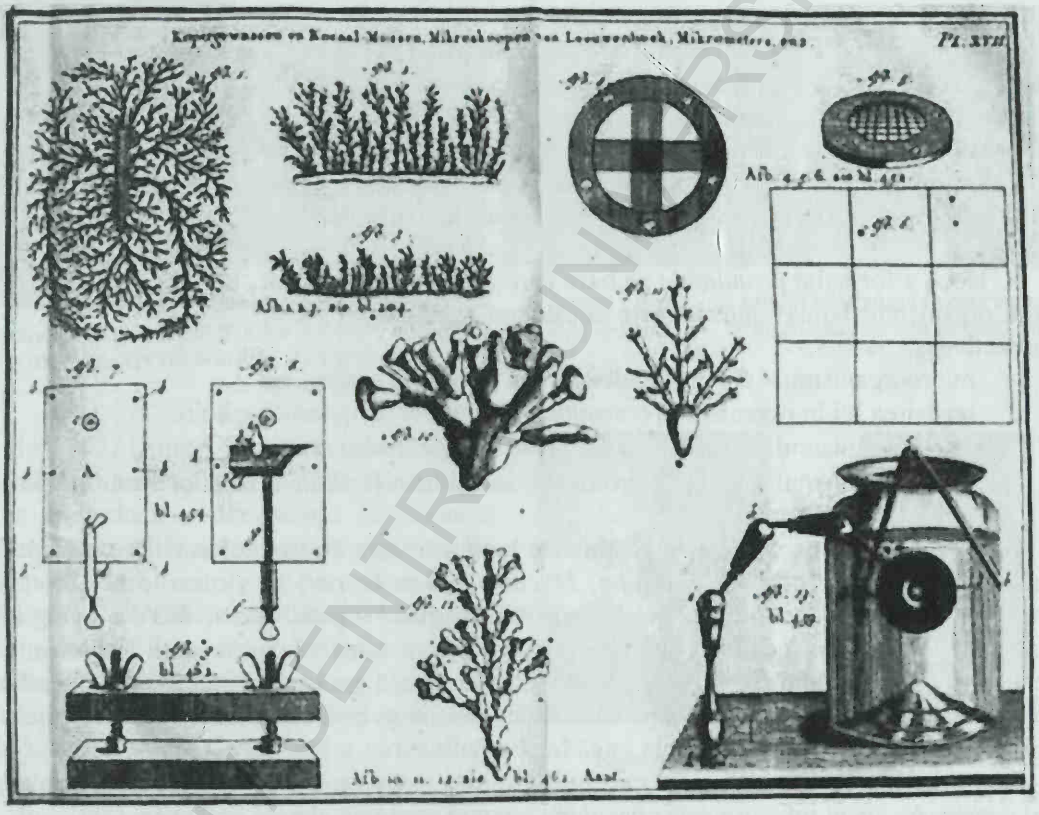
Anton Philips van Leeuwenhoek (sec. 17) a fost primul care a observat microorganismele cu ajutorul unui aparat de construcție proprie şi le-a denumit "animalcule".

Anton van Leeuwenhoek, părintele microscopului optic.

Primul microscop compus (cca 1595).



Microscopul lui Leeuwenhoek.



Desene de corali realizate de Leeuwenhoek prin vizualizare la microscop şi redarea dimensiunilor acestora exprimate în micrometri.

Ipoteza lui Francastor a fost confirmată de Louis Pasteur (sec. 19), prin *teoria germenilor*, conform căreia orice boală infecțioasă este rezultatul acțiunii vitale a unui microorganism care parazitează un alt organism. Pasteur a pus aşadar bazele teoretice ale *Microbiologiei medicale umane* şi *veterinare*, demonstrând cauzele producerii maladiilor infecțioase. Până atunci se cunoştea caracterul transmisibil (contagios) al acestora, dar nu se ştia că ele sunt rezultatul pătrunderii în organism a unor agenți patogeni. Pasteur a demonstrat că proprietățile de patogenitate şi virulență ale microorganismelor se pot modifica *in vitro*. Astfel, din culturile de bacterii patogene şi virulente derivă culturi cu virulență *atenuată*, care se pot utiliza ca *vaccinuri*.

BCU IAŞI CENTRUL UNIVERSITY LIBRARY

Louis Pasteur (18220–1895).

Pasteur a pus astfel bazele unei activități practice de o importanță practică excepțională – *vaccinarea.* A fundamentat științific domeniul imunității antiinfecțioase domeniu nou al științelor biologice – *Imunologia*, născută ca o ramură a Microbiologiei, dar care ulterior s-a separat complet, ca un domeniu de sine stătător. Este întemeietorul primului *Institut de Microbiologie* din lume – Institutul Pasteur din Paris. În plan teoretic, Pasteur a rezolvat controversa *generației spontanee*, demonstrând cu argumente experimentale că microorganismele sunt forme de viață cu un grad înalt de organizare, ce nu pot lua naștere spontan din materia organică. Totdeauna microorganismele își au originea în alte celule, care contaminează materia organică. El evidențiază în sângele animalelor moarte de cărbune (antrax) așa numita „bacteridie cărbunoasă". Existau totuși voci care afirmau că prezența acestei bacterii (*B. anthracis*) este consecința, și nu cauza bolii, sau că nu este vorba de organism viu, ci reprezintă cheaguri de fibrină.

Robert Koch (1843–1910) a obținut o cultură de *Bacillus anthracis* în ser sangvin și astfel a demonstrat fenomenul de sporulare și germinare, susținând că infecția animalelor se produce prin ingerarea materialelor vegetale contaminate cu bacterii din sol.

Robert Koch în laboratorul său (1843–1910).

Pasteur a izolat bacteria cărbunoasă de la animalele bolnave și din solul în care fuseseră îngropate cadavrele și a confirmat rezultatele lui Koch, demonstrând implicarea anelidelor în vehicularea și răspândirea sporilor; tot el a demonstrat și rolul bacililor anaerobi în etiologia gangrenei gazoase și prezența cocilor în furuncule și abcese, producând și primele vaccinuri, punând astfel bazele științifice ale vaccinării.

R. Koch a formulat *postulatele* pe baza cărora un microorganism izolat din organismul bolnav infectat este considerat agent patologic al bolii respective:

- microorganismul să fie evidențiat în toate cazurile, iar regăsirea lui în organism să corespundă leziunilor caracteristice bolii;
- microorganismul să poată fi izolat în cultură, pe mediu artificial;
- microorganismul să poată reproduce boala și manifestările leziunilor specifice pe animale sensibile de laborator.

Există o serie de excepții de la postulatele lui Koch (care au fost reformulate de către Evans), cum ar fi: bacteriile (*Treponema pallidum*, *Mycobacterium leprae*) și virusurile necultivabile sau pentru care nu au fost identificate gazde sensibile (virusul Epstein-Barr, HBV); agenții bolilor infecțioase cu perioadă de incubație foarte lungă (boli prionice, neoplazii); agenții bolilor infecțioase care necesită intervenția unor mecanisme dependente de gazdă pentru apariția procesului infecțios și care, în consecință, nu pot fi reproduse pe animale de laborator, boli cu etiologie plurifactorială și boli infecțioase, necontagioase și cu incidență mică în populație.

Pentru a încorpora toate aceste excepții, Evans a emis varianta moleculară a postulatelor lui Koch, și anume, un agent infecțios este considerat agentul etiologic al unei boli dacă:

- posedă în genom genele de virulență necesare pentru producerea procesului infecțios;
- îndepărtarea sau inactivarea genei de virulență duce la scăderea virulenței, iar introducerea genei într-o tulpină nevirulentă conduce la manifestarea virulenței;
- produsul genei de virulență induce sinteza anticorpilor protectori sau apariția imunității celulare.

Evoluția microbiologiei a fost impulsionată în sec. 19 și 20 de descoperirea și perfecționarea metodelor de examinare microscopică a microorganismelor și de cultivare pe medii artificiale.

Carl Zeiss și Ernst Karl Abbe au construit microscopul cu imersie și lentilele apocromatice.

În 1835, Agostino Bassi di Lodi descoperă o specie fungică care cauzează o boală la viermii de mătase.

Ernst Abbe
(1840–1905)

Carl Zeiss
(1816–1898)

Otto Schott
(1851–1935)

Agostino Bassi di Lodi.

Portretul celor doi cercetători şi respectiv, al tehnicianului care au dezvoltat microscopul cu imersie.

În 1847, Ignaz Semmelweiss emite ipoteza conform căreia, în spitalele din vremea sa, medicii vehiculau agentul bolii în mediul spitalicesc, contaminând nou-născuţii şi mamele în timpul naşterii şi recomandă spălarea obligatorie a mâinilor înainte de atingerea pacienţilor.

Joseph Lister a introdus în 1867 principiul antisepsiei în chirurgie şi a utilizat mediile solide şi lichide, pentru cultivarea microorganismelor.

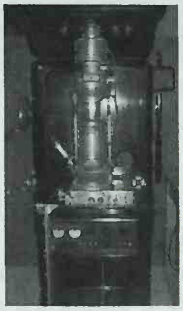
Ignaz Semmelweiss. Scenă de tablou de epocă reprezentând o sală de operaţii şi medici spălându-se pe mâini înainte de a examina gravidele sau mamele.

Joseph Lister
(1827–1912).

Lister în laboratorul în care apare rezervorul cu spray carbolic pe care l-a inventat în 1869.

În 1892, Dimitri Ivanovski a descoperit virusul mozaicului tutunului (VMT), iar în 1899 Martinus Beijerinck a demonstrat dependenţa multiplicării virale de celula gazdă. El a intuit natura particulară a agentului mozaicului tutunului şi l-a considerat ca fiind "*contagium, vivum, fluidum*" (agent contagios, viu-corpuscular-filtrabil). Iniţial, *Virologia* s-a dezvoltat ca o ramură a Microbiologiei, dar raportându-ne la natura particulară a virusurilor, Virologia a devenit o ştiinţă independentă.

Ernst Ruska.



Primul microscop electronic păstrat la muzeul tehnic din Munchen.

În 1900, Walter Reed a identificat vectorul biologic pentru agentul febrei galbene, iar Ernst August Friedrich Ruska a realizat primul microscop electronic. În România, Virologia a fost întemeiată şi dezvoltată de S. Nicolau, M. Ciucă, Constantin Levaditi.

În 1909, Paul Ehrlich, împreună cu asistentul său, Sahachiro Hata, au realizat primul tratament eficient contra sifilisului, pe bază de arsenic, numit *Salvarsan*. În 1928, Alexander Fleming a descoperit penicilina. În căutarea unor compuşi cu potenţial antibacterian, Fleming a observat inhibiţia creşterii coloniilor de *Staphylococcus aureus* în vecinătatea coloniilor fungice de *Penicillium notatum*. Apoi a arătat că mediul lichid al culturii de *P. notatum*, diluat de 800 de ori, a inhibat creşterea culturii de *S. aureus*, descoperind astfel „medicamentul miracol" – pentru care a fost distins cu premiul Nobel.

Dimitri Ivanovski.

Aspectul leziunilor produse de VMT pe frunzele de tutun.

Martinus Willem Beijerinck.

Maiorul Walter Reed.

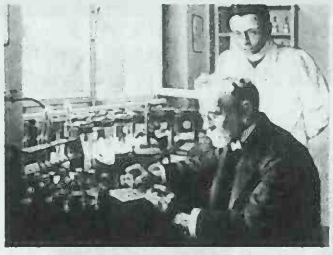
Kary Mullis (n. 1944).

În 1977, W. Gilbert şi F. Sanger au introdus tehnologia secvenţierii ADN.

În 1982, Stanley B. Prusiner a introdus conceptul de *prion*, prin care defineşte o formă de infecţie nedescrisă anterior şi cauzată de anomalii ale structurii proteinelor.

În 1983, Kary Mullis a definit şi a dezvoltat reacţia PCR (*Polymerase Chain Reaction*), iar în 1995 a fost secvenţiat primul genom bacterian (*H. influenzae*).

În România, întemeierea Microbiologiei ca ştiinţă este legată de numele a două personalităţi de excepţie, Victor Babeş şi Ioan C. Catacuzino. Victor Babeş a fost colaboratorul lui Robert Koch, a studiat turbarea şi lepra, a descoperit granulaţiile de volutină, corpusculii Babeş-Ernst, cu aspect de halou (incluzii metacromatice din citoplasma bacteriilor Gram pozitive, aşa cum este *C. diphteriae*) şi corpusculii Babeş-Negri, incluzii din celulele nervoase din creierul organismelor infectate cu rabie.



Paul Ehrlich (1854–1915) în laborator, împreună cu asistentul său, S. Tata.

Alexander Flemming (1881–1955).

F. Sanger (n. 1918).

Stanley Prusiner (n. 1942)

A demonstrat localizarea urogenitală a tuberculozei, considerată până în acel moment, exclusiv pulmonară, a folosit o metodă proprie pentru evidenţierea bacilului tuberculozei, a dovedit, în premieră mondială, rolul sistemului nervos în menţinerea echilibrului funcţional al nutriţiei celulelor şi ţesuturilor, aspect cu rol fundamental în imunitatea naturală, a studiat agentul holerei găinilor, al febrei galbene, vaccinei, erizipelului, a descris agentul cauzal al morvei la om şi pneumococul. Încă din 1896–1891, V. Babeş a dovedit experimental existenţa anticorpilor în sângele animalelor imunizate şi puterea protectoare a acestora. În 1890, a sesizat posibilitatea transferului factorilor protectori de la mamă la făt, cu doi ani înainte ca Ehrlich să arate că anticorpii trec de la mamă la făt prin placentă.

A fost iniţiatorul terapiei anti-difterice, a descoperit genul *Babesia*, parazit din familia *Haemosporidae*, a colaborat cu André Cornil la lucrarea apărută la Paris, "*Les bactéries et leur rôle dans l'anatomie et l'histologie pathologiques des maladies infectieuses (Bacteriile şi rolul lor în anatomia şi histopatologia bolilor infecţioase)*" (1885), distinsă cu premiul Monthyon, acordat de Academia de Ştiinţe din Paris, într-o şedinţă prezidată chiar de Louis Pasteur.

Profesorul Victor Babeş. Fondatorul bacteriologiei în România (1854–1926).

În 1883, Victor Babeş este primit de către Pasteur în laboratorul său. În 1884, Babeş a descris fenomenul de *antibioză* (proprietatea unor bacterii de a elabora anumite substanţe cu efect inhibitor asupra dezvoltării altui microorganism), fenomen care, o jumătate de secol mai târziu, va sta la baza antibioterapiei.

În 1887, Victor Babeş fondează primul Institut de Cercetări Medicale din Bucureşti (cu un an înainte de înfiinţarea Institutului Pasteur din Paris în anul 1888), pe baza unei liste de subscriere publică internaţională, pentru *crearea unui institut de seruri şi vaccinuri care să fie pus sub conducerea lui Pasteur şi care să poarte numele acestuia*, pentru cercetări în domeniul anatomiei patologice şi bacteriologiei, institut care poartă astăzi numele lui Victor Babeş.

Ioan Cantacuzino a fost colaboratorul lui Metchnikoff în laboratorul lui Louis Pasteur, a studiat patogeneza tuberculozei, holerei, scarlatinei, morvei, leprei, febrei tifoidice şi paratifoidice, spirochetozelor. A preparat vaccinurile tifoparatific, variolic, cărbunos, BCG (România fiind a doua ţară din lume care a introdus vaccinarea). A elaborat prima lege sanitară din România.

La iniţiativa profesorului Ioan Cantacuzino, prin legea din 4 Aprilie 1921, se înfiinţează Institutul de Seruri şi Vaccinuri Dr. I. Cantacuzino din Bucureşti. Institutul este organizat şi condus după modelul Institutului Pasteur din Paris, având drept scop urmărirea evoluţiei tuturor bolilor infecto-contagioase şi asigurarea terapiei specifice prin prepararea serurilor şi vaccinurilor necesare în scopuri profilactice şi curative.

Cunoscător al metodelor de combatere a epizootiilor, a avut un rol decisiv în dezvoltarea învăţământului medical veterinar în România, înfiinţând în 1910 primul Institut de Stat pentru Prepararea de Seruri şi Vaccinuri de uz veterinar şi Institutul Vaccinogen pentru prepararea vaccinului Jennerian.

Profesorul Ioan Cantacuzino, creatorul Şcolii de microbiologie în România (1863–1934).

Bibliografie

Israil A. 2009. Personalităţi ale Institutului Cantacuzino. Editura Asclepios
http://www.cais-soas.com/CAIS/
http://www.cesil.com/cesil99/1maln1.jpg
http://load.azzona.az/
biology.clc.uc.edu/
http://wpcontent.answers.com/wikipedia/commons/thumb/3/3b/Zacharias.jpg/250px-Zacharias.jpg
http://proto57.files.wordpress.com/2009/08/janssen_microscope.jpg
http://redes-cepalcala.org/olivaryescuela/divulgacion/3_Feria_Sevilla/Proyecto/RobertHooke.jpg www.leeds.ac.uk/.../adopt-a-book/pics/hooke.jpg,
http://www.ucmp.berkeley.edu/history/hooke.html
http://i.ehow.com/
http://vietsciences.free.fr/biographie/biologists/images/leeuwenhoek-micro.jpg
www.euronet.nl/users/warnar/leeuwenhoek.html
http://www.2blowhards.com/archives/Portrait%20of%20Louis%20Pasteur.jpg
http://www.emaramures.ro/UserFiles/Image/Foto%20Istoria%20zilei/Martie/24_03_robert-koch.jpg
http://www.amuseum.de/MikSchaffhaus/Folie28.JPG
www.dmipfmv.ulg.ac.be/bacvet/
http://random1881.files.wordpress.com/2008/12/ignaz-semmelweis.jpg
www.seed.slb.com/content.aspx?id=30290
web.ukonline.co.uk/b.gardner/Lister.html
http://web.ukonline.co.uk/b.gardner/listlab.gif
e-ciencia.com/.../Martinus_Beijerinck
http://www.zone10.com/images/mosaic-virus.jpg
http://www.knowledgerush.com/wiki_image/4/4e/WalterReed.jpeg
http://www.cap.ca/pic/Archives/55.4(1999)/herzberg.gif
Ernst Ruska Electron Microscope - Deutsches Museum - Munich-edit.jpg
http://www.marvistavet.net/assets/images/Alexander_Fleming.gif
http://www.todayinsci.com/S/Sanger_Frederick/SangerFrederickThm.jpg
http://www.aqtc.edu.cn/jxwz/wuhua/wlhx/jieshao/2j/Nobel%20Prize%20for%20Chemistry/chemistry-1980-3.gif
http://3.bp.blogspot.com/_DZH2cmCoois/SO0DjCunYAI/AAAAAAAAGD0/hFud7X5dHfk/s400/Nobel_Laureates_1997_Pusiner.jpg
http://arjunpuri.files.wordpress.com/2009/10/5-kary-mullis.jpg.

2. STRUCTURA ŞI FUNCŢIILE CELULEI BACTERIENE

Cunoaşterea structurii interne a celulei bacteriene este rezultatul utilizării tehnicilor de citochimie şi de microscopie electronică.

Structura reper a celulei bacteriene este *peretele celular*. În raport cu peretele se disting structurile *intraparietale* (care alcătuiesc protoplastul bacterian) şi structurile *extraparietale*.

Structurile intraparietale sunt:

- spaţiul periplasmic;
- membrana plasmatică;
- mezosomul;
- citoplasma;
- ribosomii;
- incluziile;
- vacuolele;
- sporul;
- aparatul fotosintetic;
- rhapidosomii (*rhapidos* = baston) – incluzii ribonucleoproteice în formă de baston;
- magnetosomii – incluzii intracelulare cu structură cristalină delimitate de membrană, formate din magnetită (Fe_3O_4). Magnetosomii conferă dipol magnetic permanent celulei, permiţându-i să se alinieze pasiv la câmpul geomagnetic. Bacteriile care produc magnetosomi manifestă *magnetotaxie*, adică procesul de orientare şi migrare de-a lungul liniilor câmpului magnetic.

Structurile extraparietale sunt reprezentate de:

- glicocalix cu variantele sale structurale: capsula şi glicocalixul comportamental;
- flageli;
- fimbrii şi pili;
- spini – structuri pericelulare groase la bază şi ascuţite la vârf.

Unele structuri (membrana, citoplasma, nucleoidul, ribosomii) sunt *esenţiale* (obligatorii) şi se găsesc la toate celulele bacteriene. Altele sunt *facultative* (spor, aparat fotosintetic, capsulă, flageli), fiind prezente numai la anumite grupe de bacterii.

2.1. Peretele celular

Peretele celular este o structură rigidă de înveliş, care înconjoară complet celula bacteriană. La cele mobile, peretele este străbătut de flageli. Structura parietală lipseşte la bacteriile din grupul *Mycoplasma*, precum şi la cele halofile extreme (cele care trăiesc în medii saline foarte concentrate, unde structura protectoare faţă de şocul osmotic nu este necesară). Un criteriu empiric cu o valoare practică deosebită în clasificarea şi identificarea procariotelor este comportamentul la coloraţia Gram (C. Gram, 1884). Caracterul Gram pozitiv sau Gram negativ reflectă deosebirile structurale majore ale celor două grupuri de bacterii. Coloraţia Gram implică tratamentul succesiv al celulelor cu cristal-violet (un colorant bazic), urmat de tratamentul cu soluţie de iod în KI şi ulterior, extracţia cu un solvent organic polar (alcool sau acetona). În celulă, cristal-violetul şi iodul formează un complex insolubil. Celulele care rezistă etapei decolorării şi reţin complexul insolubil (cristal violet-iod) violet închis sunt celule Gram pozitive, iar cele care nu reţin colorantul sunt Gram negative. Caracterul Gram pozitiv sau Gram negativ reflectă deosebiri structurale majore ale peretelui celular.

În funcție de particularitățile structurale ale peretelui, bacteriile se împart în 4 categorii:

1. *Firmacutes* (*firmus* = tare; *cutis* = înveliș) sunt bacteriile Gram pozitive, cu perete celular gros şi rigid, la care mureina reprezintă până la 80% din greutatea uscată a acestei structuri şi bacteriile acido-alcoolo-rezistente.

2. *Gracillicutes* (*gracillis* = subțire, fin) sunt bacteriile Gram negative cu perete subțire, la care mureina reprezintă circa 10% din greutatea uscată a peretelui.

3. *Mendosicutes* (*mendosus* =o structură cu defecte). Noțiunea desemnează organismele domeniului *Archaea*, care au perete celular din care lipseşte mureina.

Marea majoritate a bacteriilor cunoscute aparțin grupului Gram pozitive sau Gram negative.

4. *Mollicutes* sau *Tenericutes* (*mollis, tener* = moale) cuprinde bacteriile din grupul *Mycoplasma*, lipsite de perete. Periferia celulei este acoperită de o membrană ce conține *steroli*, cu rol protector față de liza osmotică. Sunt cele mai mici bacterii cunoscute, cu capacitatea de a creşte pe medii inerte.

2.1.1. Structura moleculară a peretelui la bacteriile Gram pozitive

La bacteriile Gram pozitive, peretele celular este gros, rezistent şi rigid. Componenta esențială este *mureina,* denumită încă şi *peptidoglican, glicopeptid, mucopeptid* sau *glucozaminopeptid.* Mureina formează un strat rigid, adiacent membranei plasmatice, iar sub aspectul compoziției chimice este unitară la toate eubacteriile (Gram pozitive şi Gram negative).

Mureina este alcătuită dintr-o componentă peptidică şi una glucidică. Componenta glucidică repetitivă este un dizaharid format din *N-acetil-D-glucozamină* şi *acid N-acetilmuramic*, legate β 1-4. Acidul *N-acetilmuramic* rezultă prin stabilirea unei legături esterice între N-acetil-D-glucozamină şi acidul lactic (fig. 1). La fiecare unitate diglucidică este legată o componentă peptidică, reprezentată de un tetrapeptid, a cărui compoziție în aminoacizi este variabilă în funcție de specie, dar conține *L-alanină, acid D-glutamic, acid diaminopimelic* (derivat al lizinei) sau lizina şi *D-alanina* şi se leagă de acidul N-acetilmuramic (fig. 1, 2). *Acidul N-acetil muramic şi D-aminoacizii sunt markeri biochimici ai eubacteriilor.*

Legăturile glicozidice nu sunt suficiente pentru a asigura rigiditatea structurii parietale. Tetrapeptidele sunt legate prin punți peptidice transversale (fig. 3). La bacteriile Gram negative, punțile peptidice transversale reunesc gruparea NH_2 a acidului diaminopimelic, cu gruparea COOH a D-Ala terminale a peptidului adiacent.

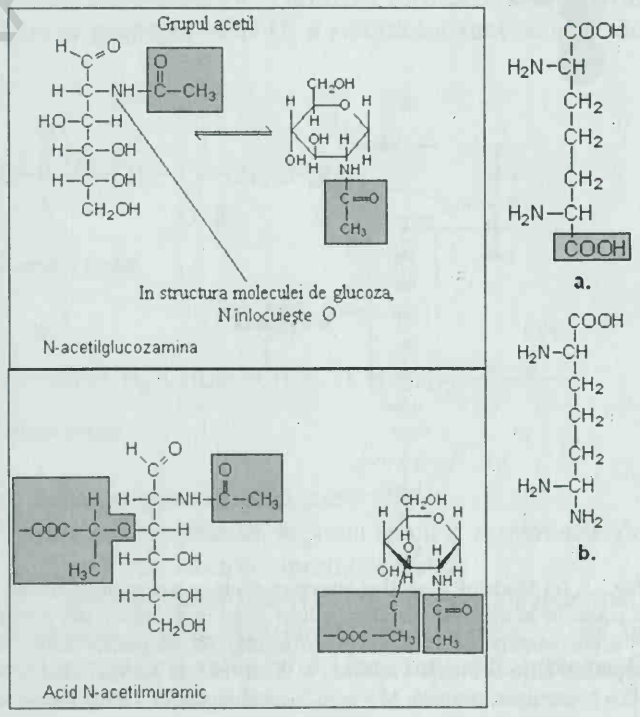


Fig. 1. Derivații glucidici cei mai comuni în structura peretelui celular bacterian: N-acetil-glucozamina şi acidul N-acetilmuramic. a. Acidul diaminopimelic, derivat al lizinei. b. Lizina.

CU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

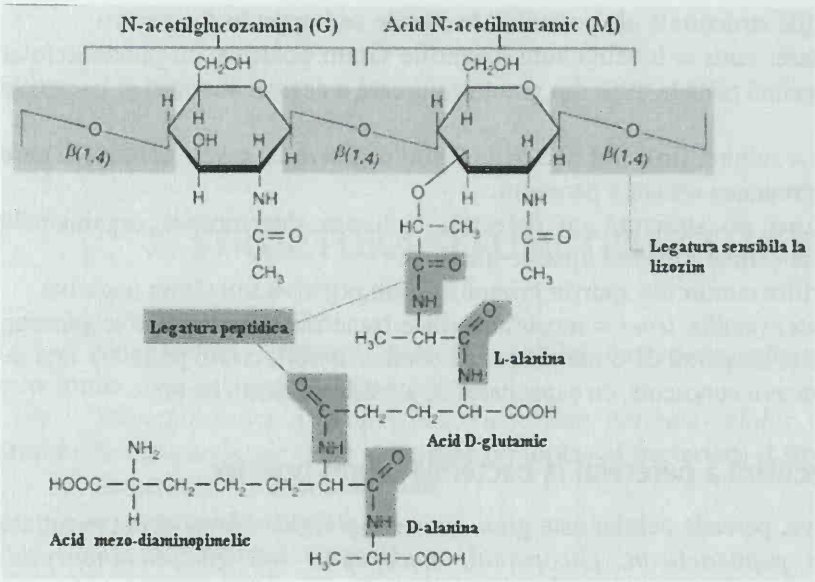


Fig. 2. Structura glicanului tetrapeptidic, una dintre unităţile repetitive ale peptidoglicanului structurilor parietale. Această structură chimică se găseşte la *E. coli*, dar bacteriile conţin şi alţi aminoacizi.

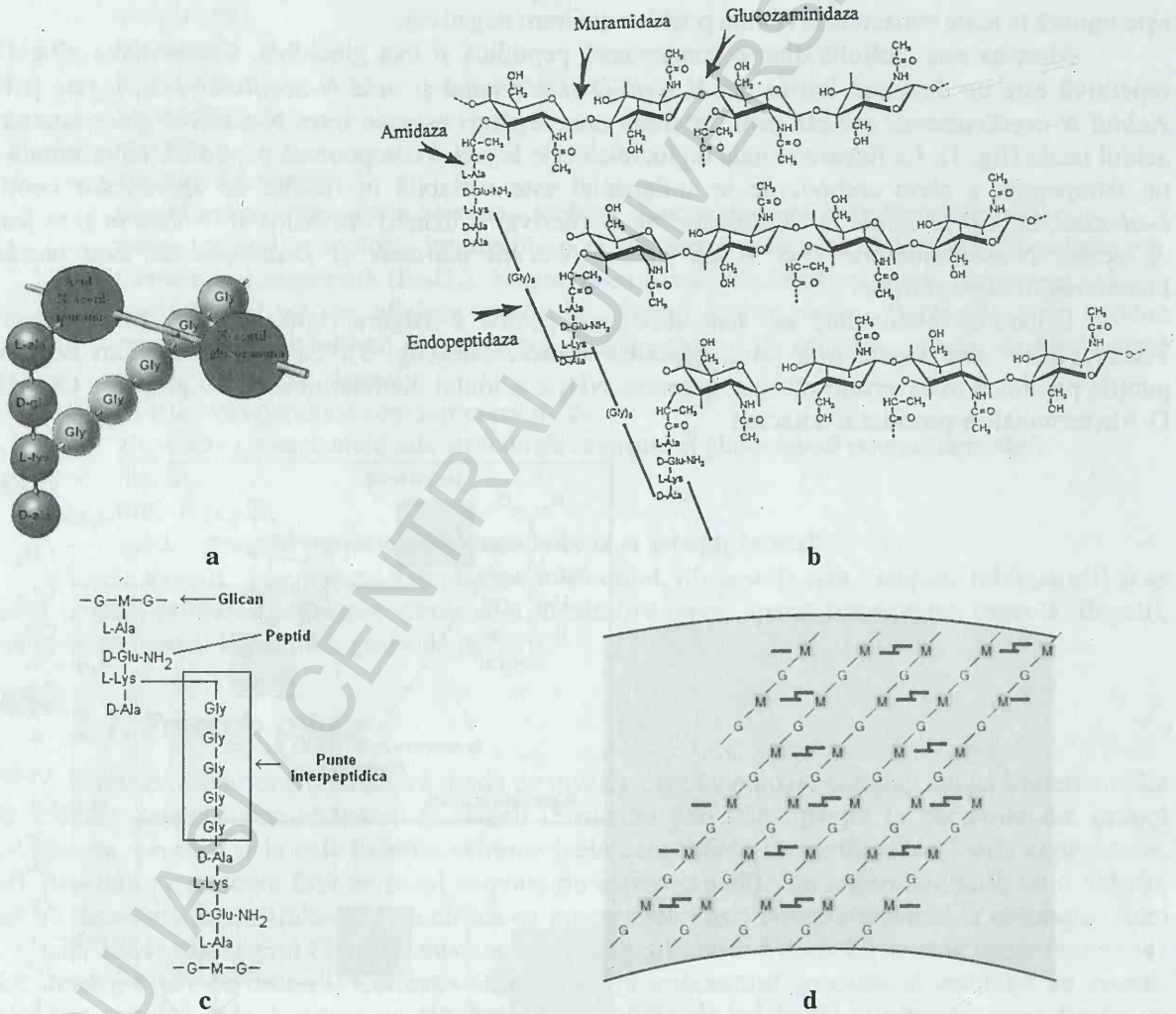


Fig. 3. (a) Modelul general al structurii chimice a peptidoglicanului. (b) Săgeţile indică situsurile la care peptidoglicanul poate fi atacat de hidrolazele peretelui celular. Sunt reprezentate trei catene de peptidoglican ce constau din resturi alternante de acid N-acetil muramic şi N-acetil glucozamină. Tetrapeptidele legate de acidul N-acetilmuramic sunt interconectate prin punţi peptidice cu o secvenţă variabilă, la *S. aureus* de *pentaglicină* (c), (d) Reprezentarea structurii generale a peptidoglicanului (G = N-acetilglucozamina; M = acid N-acetilmuramic). Liniile groase reprezintă legături peptidice transversale (după Brock, 1988).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cu cât numărul de legături peptidice este mai mare, cu atât creşte rigiditatea peretelui. Se formează astfel o structură covalentă perfect continuă în jurul celulei, o moleculă mureinică gigantă, un adevărat *sac mureinic*, cu structură tridimensională dinamică.

Peptidoglicanii diferitelor specii diferă prin aminoacizii 2 şi 3 ai tetrapeptidului şi prin frecvenţa punţilor transversale de pentaglicină. Speciile patogene au o frecvenţă superioară a punţilor transversale, ceea ce se corelează cu o rezistenţă mai mare a mureinei la acţiunea factorilor litici din umorile organismului (lizozimul etc.).

Sinteza peptidoglicanului începe cu sinteza în citoplasmă a complexului *UDP-acid N-acetilmuramic-pentapeptid,* ataşat de bactoprenol (un lipid al membranei), cuplat ulterior cu o moleculă de N-acetilglucozamină de la UDP. Dizaharidul este polimerizat la un intermediar oligozaharidic şi este transferat la capătul în curs de sinteză al polimerului glicolipidic parietal.

Legarea transversală este rezultatul unei reacţii de *transpeptidare*, în care grupul $-NH_2$ al unui rest de pentaglicină înlocuieşte D-Ala terminală a peptidului învecinat. Reacţia de transpeptidare este catalizată de PBP (*penicillin binding proteins*). PBP leagă covalent penicilina şi alte antibiotice β-lactamice, datorită asemănării structurale parţiale dintre antibiotic şi precursorul pentapeptidic.

Calea biosintetică oferă explicaţia acţiunii selective a unor agenţi antibacterieni (lizozimul şi penicilina) asupra peretelui mureinic.

Lizozimul clivează legăturile glicozidice β 1-4 şi hidrolizează mureina celulelor aflate în *faza staţionară.*

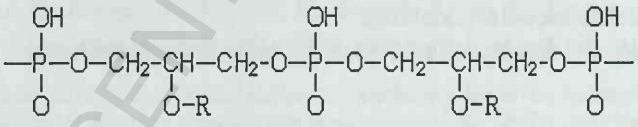
Penicilina inhibă celulele bacteriene aflate în *faza de creştere*, deoarece inhibă treapta finală a sintezei mureinei, reacţia de *transpeptidare*, adică formarea legăturilor peptidice transversale între catenele de glican adiacente. Inhibiţia transpeptidării sub acţiunea penicilinei duce la formarea unui peptidoglican subţire, urmat de liza şi moartea celulei, pentru că autolizinele continuă să funcţioneze, iar alte punţi peptidice nu se mai formează. De aceea, penicilina este activă numai asupra celulelor care cresc. În celulele care nu cresc, autolizinele nu sunt active şi peptidoglicanul nu este degradat.

Orice compus chimic care interferă cu sinteza peptidoglicanului are ca rezultat sinteza unui perete discontinuu sau mai subţire şi liza celulei.

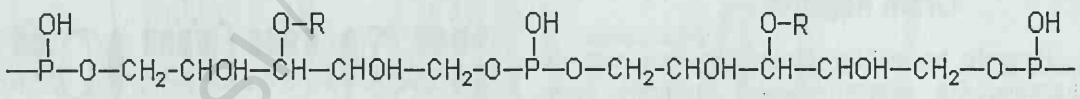
La nivelul peretelui mureinic sunt localizate enzimele care modelează creşterea sa: *murein-hidrolazele* taie legăturile chimice ale mureinei, iar *murein-sintetazele* inseră noi unităţi de construcţie.

Mureina formează o matrice, în care se găsesc alţi polimeri: polizaharide, acizi teichoici.

Acizii teichoici sunt molecule lungi şi flexibile. Din punct de vedere chimic sunt polimeri de l-3-*poliglicerol-fosfat* sau de *poli-ribitol-fosfat*, legaţi fosfo-diesteric. Polimerii formează axul central al moleculei. Grupările –OH libere ale glicerolului şi gruparea –OH C_3 a ribitolului sunt ocupate de resturi de D-Ala, D-Glc sau de N-AcGlc.



Poliglicerol – fosfat.



Poliribitol fosfat.

La bacteriile Gram pozitive sunt prezente două categorii de acizi teichoici:

- *acizi lipoteichoici* (ALT), care traversează peptidoglicanul, legându-se cu o extremi-tate de glicolipidele din membrană, iar celălalt capăt este liber la suprafaţa celulei;
- *acizi teichoici parietali*, ataşaţi covalent de resturile de acid N-acetilmuramic ale mureinei.

Împreună cu mureina, acizii teichoici formează o reţea polianionică sau matrice, cu rol în menţinerea echilibrului cu cationii metalici, dar şi în reglarea traficului de ioni, nutrienţi, proteine şi antibiotice.

Funcţiile acizilor teichoici sunt multiple:

- acizii teichoici sunt structuri moleculare filamentoase, care conferă un plus de rigiditate peretelui celular al bacteriilor Gram pozitive;
- fiind polianionici, au rol în transportul cationilor metalici în/şi din celulă;
- au rolul de receptori de fagi;
- au rolul de *adezine* (mediază aderenţa celulei la substrat, favorizând formarea biofilmelor), conferă rezistenţă la antibiotice. La bacteriile patogene, acizii teichoici sunt un factor de virulenţă, deoarece au proprietăţi chimiotactic negative faţă de fagocite. Acizii teichoici parietali sunt imunogeni, atât în stare liberă, cât şi asociaţi celulei.

Uneori bacteriile secretă cantităţi mari de acizi teichoici solubili.

Bacteriile Gram pozitive care nu au acizi teichoici prezintă molecule anionice cu funcţii asemănătoare (de exemplu, lipomananul, în locul ALT la *Micrococcus luteus*).

2.1.2. Peretele celular acido-alcoolo- rezistent al micobacteriilor

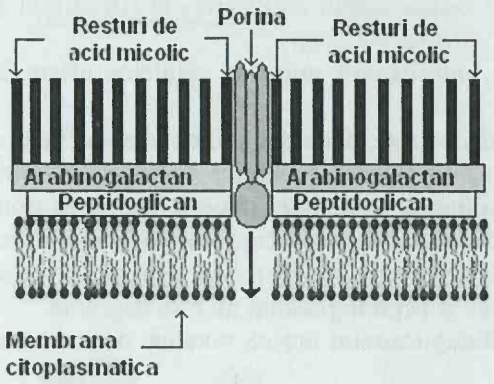


Fig. 4. Reprezentarea schematică a componentelor peretelui celular acido-rezistent la grupul *Mycobacterium – Nocardia.* Regiunea externă a învelişului conţine unităţi lungi de acid micolic legat de arabinogalactan (după Holt, 1998).

Unele bacterii (*Mycobacterium tuberculosis, Corynebacterium diphteriae, Nocardia asteroides)* au perete celular cu o structură chimică particulară (fig. 4). În compoziţia sa intră lipide complexe, care nu se găsesc în structura parietală a altor bacterii. Celulele bacteriene se colorează slab după protocolul coloraţiei Gram, dar se colorează la cald cu fuxină bazică concentrată şi sunt rezistente la decolorare succesivă cu acid sulfuric diluat şi alcool etilic 96%. Aceste organisme se numesc *acido-alcoolo-rezistente.*

Rezistenţa la decolorare se datorează compoziţiei chimice a peretelui celular. Peptidoglicanul micobacteriilor conţine acid diaminopimelic ca acid diaminic major, iar acidul muramic este N-glicozilat (şi nu N-acetilat).

Un alt compus major parietal al micobacteriilor este polizaharidul cu greutate moleculară mare – *arabinogalactanul,* un copolimer polizaharidic, alcătuit din *arabinoză* şi *galactoză*, esterificate cu acizi graşi cu catenă lungă – *acizii micolici* – cu 70–90 atomi de C. La *Corynebacterium* şi *Nocardia*, acizii graşi au catenă mai scurtă (40–60 de atomi de C). Glicolipidele complexe din structura peretelui conferă proprietatea de acido-alcoolo-rezistenţă.

A II-a categorie de lipide, cele "libere", sunt lipooligozaharide ce conţin trehaloza şi lipoarabinomanani.

2.1.3. Peretele celular la bacteriile Gram negative

Peretele bacteriilor Gram negative este mai complex, datorită prezenţei unei structuri caracteristice denumită *membrana externă,* o replică structurală a membranei plasmatice, care poate fi astfel considerată ca *membrană internă* (fig. 5). Membrana externă, ca şi celelalte membrane biologice, este alcătuită dintr-un strat lipidic dublu, puţin permeabil pentru moleculele hidrofile. În stratul lipidic sunt inclavate proteine, denumite *porine*, ce formează canale pentru influxul nutrienţilor şi pentru eliminarea produselor de catabolism.

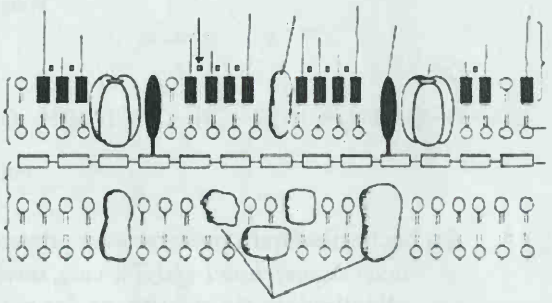


Fig. 5. Reprezentarea schematică a structurii moleculare a peretelui celular la bacteriile Gram negative. Proteinele trimere matriceale din membrana externă sunt asociate cu lipoproteine şi cu lipopolizaharide (LPS). LPS sunt legate covalent de peptidoglican.

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

Porinele s-au găsit la toate bacteriile Gram negative şi chiar la un grup de bacterii Gram pozitive: *Corynebacterium-Nocardia-Mycobacterium*, care produc un perete celular bogat în lipide, asemănător dublului strat.

Analiza filogeniei organismelor procariote pe baza secvenţierii proteinelor a dus la concluzia existenţei unor diferenţe filogenetice majore între organismele cu înveliş dublu membranar (''didermice'') şi cele cu membrană simplă (''monodermice'').

La microscopul electronic, membrana externă a peretelui apare pluristratificată. Componentele chimice sunt fosfolipide (35% din greutatea uscată), proteine (15%) şi lipopolizaharide (50%).

Proteinele membranei externe se numesc *porine*, deoarece reglează permeabilitatea şi constituie canalele membranare de transport celular. Iniţial s-au descris trei tipuri de porine: OmpF, OmpC şi PhoE. Analiza prin metoda cristalografiei cu raze X relevă că porinele sunt *proteine transmembranare* trimerice cu o secvenţă de 250–450 aminoacizi, a căror configuraţie secundară este cea de β-pliere. Aproape invariabil, secvenţele porinelor au la capătul C-terminal *fenil-alanina*, sau rareori *triptofanul*. Porinele au funcţie de canale de difuzie a moleculelor mici. Unele porine sunt permeabile pentru orice moleculă mai mică de 600 Da, altele sunt bariere selective de permeabilitate pentru anioni sau cationi, sau favorizează trecerea moleculelor polare* în raport cu cele nepolare. O celulă de *E. coli* produce circa 10^5 molecule porine. În mediul hiperosmotic, numărul porinelor diminuează.

* Grupările *polare* conţin atomi de O, S sau N, ce acţionează ca acceptori de legături de H prin intermediul cărora interacţionează cu alte grupări de semn opus sau cu apa ca solvent.

O moleculă sau un grup de atomi este *nepolar*, dacă îi lipsesc atomii electronegativi – N, O, S, astfel că nu conţine grupări cu sarcini electrostatice importante: steroizii şi alte lipide, lanţurile lungi hidrocarbonate ale aminoacizilor Leu, Ileu, Val.

Cel puţin la enterobacterii, dublul strat fosfolipidic al membranei externe este asimetric:

- stratul extern conţine aproape exclusiv LPS;
- stratul intern conţine aproape exclusiv fosfolipide.

Lipoproteinele leagă ferm membrana externă de peptidoglicanul profund (Magnuson şi colab., 1993).

La bacteriile Gram negative, mureina reprezintă numai 2,5–10% din greutatea uscată a peretelui.

Mureina este localizată în stratul cel mai intern al peretelui. După un tratament adecvat, membrana externă se poate îndepărta şi se obţine sacul mureinic pur, extrem de fin, care păstrează forma originală a celulei şi care sugerează că mureina ar putea fi o reţea bidimensională (un monostrat molecular), în timp ce la bacteriile Gram pozitive cantitatea de peptidoglican corespunde la minimum 20 de straturi moleculare.

Lipopolizaharidele (LPS) sunt inclavate în membrana externă. Ele sunt de fapt *endotoxinele*** bacteriilor Gram negative (*Salmonella, Shigella, Escherichia)* (fig. 6). Deşi sunt localizate la suprafaţa celulei, se numesc *endotoxine*, deoarece se eliberează numai după pierderea integrităţii celulei.

** Termenul LPS este atribuit extractelor bacteriene purificate, libere de contaminanţi detectabili, în special proteine. Endotoxina este produsul de extracţie cu acid tricloracetic, butanol sau EDTA, care constă din macromolecule LPS, proteine şi fosfolipide.

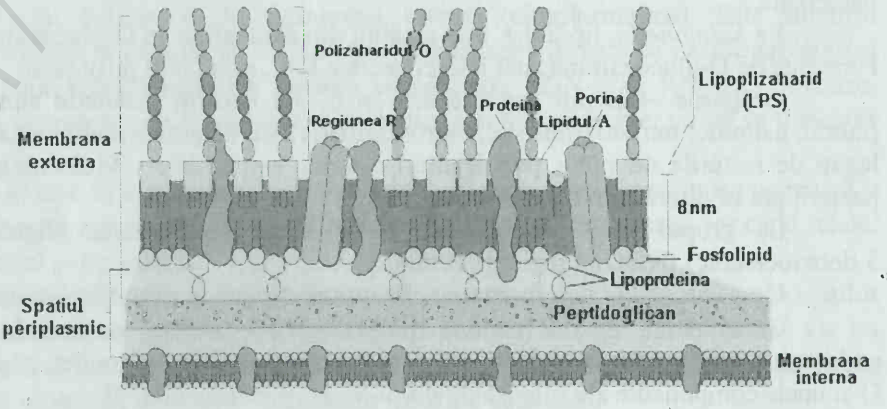


Fig. 6. Raporturile macromoleculelor componente ale peretelui celular (după Todar, 2004).

CU IASI / CENTRUL UNIVERSITAR

2.1.3.1. Structura chimică a moleculei de LPS

Din punct de vedere chimic, LPS sunt molecule complexe, fiind alcătuite dintr-o fracție lipidică și una polizaharidică. De aici derivă proprietățile *amfipatice* ale acestui agregat molecular, conferit de grupări polare hidrofile și grupări apolare hidrofobe.

Datorită poziției lor externe, LPS se pot extrage din celule, cu fenol 45-60%.

La microscopul electronic, filamentele LPS au o structură trilaminară, corespunzătoare celor două straturi poliozidice și stratului lipidic.

Cele mai studiate LPS sunt cele produse de tulpinile de *Salmonella*. Din punct de vedere structural, molecula LPS are trei regiuni (Schnaitman și Klena, 1993) (fig. 7a):

- regiune *polizaharidică externă* (polizaharidul O)
- regiune *oligozaharidică intermediară* (regiunea R)
- regiune internă hidrofobă, denumită *lipidul A*, prin care LPS se ancorează în membrana externă, printre moleculele fosfolipidice.

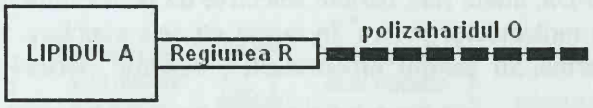


Fig. 7a. Reprezentarea schematică a structurii moleculei de LPS.

Regiunile intermediară și internă ale moleculei LPS au compoziție chimică relativ constantă la diferite specii de bacterii Gram negative.

Polizaharidul regiunii externe este un polimer de până la 100 de resturi glucidice, format din unități oligozaharidice repetitive, care conferă specificitate serologică de grup unor bacterii Gram negative (de exemplu, *Salmonella Shigella, Vibrio, E. coli*). Unitățile oligozaharidice conțin 2–4 glucide: D-manoza, D-galactoza, L-ramnoza, o dezoxihexoză, o didezoxihexoză. Didezoxihexozele sunt zaharuri care nu există în stare liberă în natură, dar intră frecvent în structura polizaharidului enterobacteriilor și au primit denumiri care derivă de la speciile de origine: abequoza, tiveloza, paratoza, colitoza.

Variația antigenică a polizaharidului regiunii externe se amplifică pe următoarele căi:

– schimbări ale poziției legăturilor (de exemplu, 1–4 în loc de 1–6);
– configurații* moleculare modificate;
– înlocuiri la nivelul diferitelor subunități repetitive;
– deleția sau substituția unui rest glucidic din subunitățile oligozaharidice.

* *Configurația* moleculei se referă la raportul geometric între un set de atomi (de exemplu, cei care deosebesc acizii L de acizii D). Conversia între variantele configurației necesită ruperea legăturilor covalente. *Conformația* se referă la raportul spațial al atomilor în moleculă. Conversia între variantele conformaționale se face fără ruperea legăturilor covalente.

Regiunea centrală a LPS ("miezul" R) este formată dintr-un oligozaharid de până la 15 resturi, legat covalent la poziția 3 a lipidului A printr-un trizaharid, 2-ceto-3-dezoxioctonat (KDO). Are o variabilitate chimică mult mai restrânsă și conferă specificitate de gen.

Lipidul A este legat covalent de oligozaharidul regiunii centrale R, fiind inserat și ancorat, prin catenele acizilor grași, cu lipidele membranei externe. Întreaga moleculă LPS este astfel orientată, încât polizaharidul O se proiectează la exterior și determină specificitatea antigenică a celulei bacteriene.

La *Salmonella*, lipidul A este alcătuit din dizaharide de D-glucozamină, legate β l'–6 (fig. 7b). Perechile de D-glucozamină sunt interconectate l–4', prin punți pirofosfat.

Grupările –OH din pozițiile 3, 4 și 6' ale fiecărui dizaharid sunt substituite de acizi grași (lauric, palmitic, miristoximiristic, hidroximiristic), cu lungimea medie a catenei de 10–28 atomi de C, legați de resturile de zahăr prin legături esterice sau amidice. Moleculele lipidice A ale diferitelor bacterii pot să difere prin resturile glucidice.

La grupul –OH din poziția 3 se leagă componenta oligozaharidică (acidul 2-ceto, 3-deoxioctanoic) (KDO) a regiunii centrale.

Grupările $-NH_2$ ale glucozaminei sunt substituite de acidul D-3-hidroximiristic.

Componenta lipidică conferă moleculei LPS calitatea de toxină. Lipidul A are proprietăți endotoxice, evidențiate la mutantele R care sintetizează LPS incomplet, căruia îi lipsește polizaharidul O și unele componente ale oligozaharidului regiunii intermediare R.

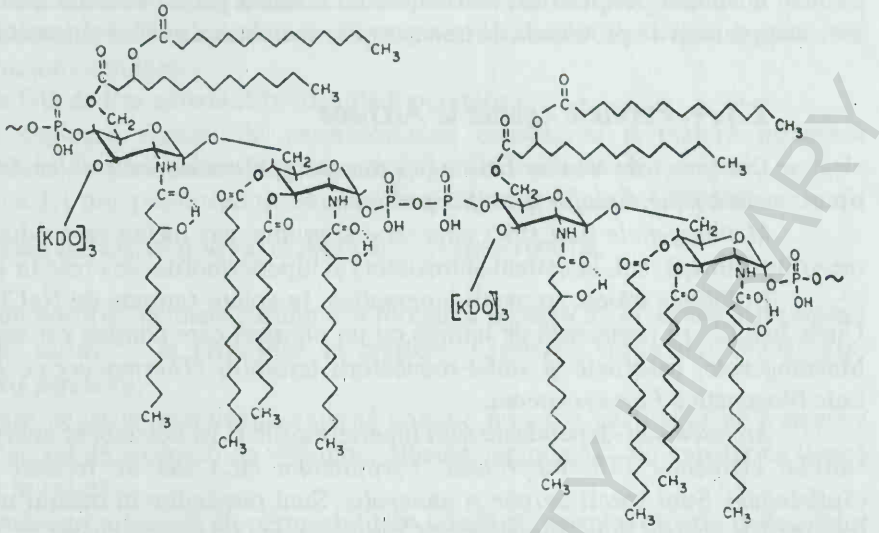


Fig. 7b. Structura lipidului A al LPS de *Salmonella*, cu trizaharidul KDO (keto-deoxi-octanoic) şi cu resturile de acizi graşi.

În mediile naturale, cele mai multe bacterii sintetizează polizaharidul O şi formează colonii *S.* Cele care nu sintetizează polizaharidul O formează colonii *R.* Polizaharidul O nu este factorul determinant al patogenităţii, deoarece formele coloniale *R* ale *B. pertusis, N gonnorhoeae* sunt patogene.

Moleculele de LPS formează baza structurală a membranei externe.

LPS este *polianionică* datorită sarcinilor negative ale lipidului A şi leagă cationi. Moleculele adiacente polianionice de LPS sunt aparent legate electrostatic, una de alta, prin cationi bivalenţi (Ca^{2+}, Mg^{2+}) şi formează o structură compactă ca un "acoperiş de ţiglă", pe suprafaţa membranei externe. Situsurile LPS care leagă cationii sunt esenţiale pentru integritatea membranei externe, dar în acelaşi timp ele reprezintă "călcâiul lui Ahile" al acestei structuri, deoarece antibioticele *policationice* din grupul *polimixinei* se complexează avid cu LPS şi dezorganizează membrana externă, mărind permeabilitatea pentru agenţii cu acţiune asupra membranei sau componentelor citoplasmatice. Toţi agenţii policationici se leagă de LPS anionice, cu o afinitate variabilă. Bacteriile Gram negative sunt rezistente la detergenţii anionici şi neutri, dar sunt sensibile la detergenţii monocationici.

Agenţii chelatori ai ionilor de Ca^{2+} şi Mg^{2+} dezorganizează şi permeabilizează membrana externă (Vaara, 1992).

Reacţia la coloraţia Gram nu se corelează strict cu compoziţia chimică a peretelui, ci depinde de structura sa fizică, de starea fiziologică a celulei, de integritatea ei structurală. Astfel, levurile, deşi au perete celular gros, dar cu o compoziţie chimică diferită de a mureinei, se colorează Gram pozitiv, iar bacteriile Gram pozitive îmbătrânite se colorează Gram negativ.

2.1.3.2. Spaţiul periplasmic

Spaţiul periplasmic este un compartiment celular al bacteriilor Gram negative, delimitat de membrana externă a peretelui celular şi de membrana internă (citoplasmatică). Este singurul compartiment al celulei procariote şi conţine un volum apos semnificativ în care se găsesc proteine şi oligozaharide. Proteinele sunt reprezentate de enzime *degradative* (DN-aza, RN-aza, proteaze, fosfataze, penicilinaza etc.) şi proteine de *legare* specifice pentru diferite molecule, cu rol în transport şi chimiotaxie.

Oligozaharidele se găsesc în concentraţii variabile şi au rolul de a regla presiunea osmotică a celulei. Când presiunea osmotică a mediului creşte, oligozaharidele trec în citoplasmă, iar când scade, oligozaharidele revin în spaţiul periplasmic.

Spaţiul periplasmic îndeplineşte o funcţie esenţială ce constă în acumularea nutrienţilor moleculari din mediu, înainte de a pătrunde în celulă. Spaţiul periplasmic funcţionează ca un compartiment adaptativ, a cărui funcţie de depozit este foarte importantă, deoarece bacteriile Gram negative trăiesc, de cele mai multe ori, în mediile oligotrofe (mediile aquatice).

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ LIBRARY

În spațiul periplasmic, nutrienții sunt scindați parțial sub acțiunea enzimelor degradative și de aici sunt preluați de proteinele de transport din membrana internă și transferați în celulă.

2.1.4. Peretele celular la *Archaea*

Din punct de vedere fiziologic, microorganismele *domeniului Archaea* sunt împărțite în trei tipuri: *metanogene, halofile și sulf-dependente.*

Metanogenele sunt strict *anaerobe* și produc gaz metan ca produs final al fermentației. Pot fi mezofile (din apă, sol, intestinul animalelor) și hipertermofile, ce cresc la 110° (*Methanopyrus).*

Halofilele trăiesc în medii *hipersaline,* în soluții saturate de NaCl (*Halobacterium halobium).* Unele halofile se protejează de lumină cu un pigment care conține carotenoizi. Sunt *aerobe obligate.* Metanogenele, halofilele și sulfat-reducătorii termofili (*Thermococcus, Pyrococcus)* sunt incluse în linia filogenetică *Euryarchaeota.*

Archaea sulf-dependente sunt hipertermofile și își dobândesc energia prin reacții de reducere a sulfului elementar (*Thermoproteus, Pyrodictium* etc.) sau de oxidare a compușilor reduși ai S (*Sulfolobus).* Sunt specii *aerobe și anaerobe.* Sunt răspândite în mediul marin și în mediile vulcanice terestre. Ele aparțin liniei filogenetice *Crenarchaeota (crenos* = izvor*).*

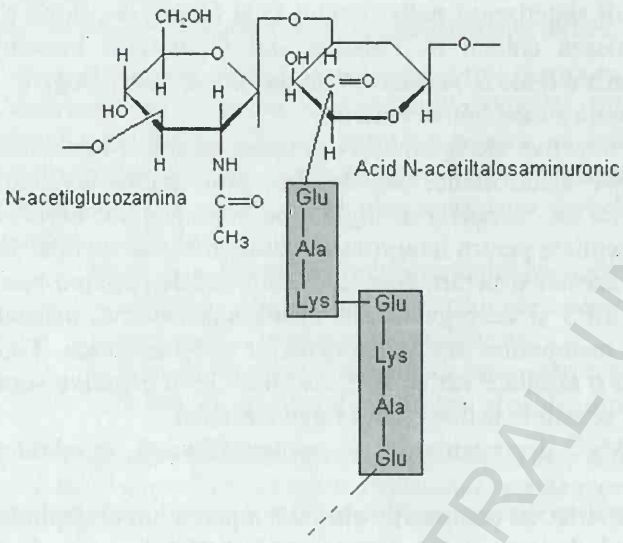


Fig. 8. Structura pseudomureinei, polimerul peretelui celular la *Methanobacterium sp.*

La *Archaea*, peretele celular prezintă diferențe structurale majore, comparativ cu al eubacteriilor (fig. 8). Diferitele specii de *Archaea* se colorează Gram pozitiv sau Gram negativ. Peretele lor nu conține acid muramic sau D-aminoacizi, markeri biochimici ai mureinei.

Din punct de vedere chimic, peretele la *Archaea* este heterogen. La *Archaea* Gram pozitive (*Methanobacterium* – producătoare de metan), peretele conține o *pseudomureină, metanocondroitină* sau *heteropolizaharide.*

Pseudomureina (markerul biochimic al metanobacteriilor) este alcătuită din unități repetitive formate din două zaharuri aminate (N-acetilglucozamină și acidul N-*acetiltalosaminuronic*, markerul biochimic al metanobacteriilor), legate β 1–3. Resturile acidului N-acetiltalosaminuronic sunt legate prin *punți peptidice* (ca și la mureină), iar aminoacizii sunt numai izomeri L. Legăturile β 1–3 ale pseudomureinei sunt rezistente la acțiunea lizozimului. Componenta peptidică este alcătuită din 3 L-aminoacizi: acid glutamic, alanina și lizina.

Ambele componente pot fi modificate: N-acetilglucozamina poate fi înlocuită total sau parțial de N-acetilgalactozamină, iar resturile de glicină, treonină, ornitină sau asparagină pot lua locul celor 3 aminoacizi, dacă sunt în concentrații mari în mediul de creștere.

Mureina și pseudomureina sunt componente omologe ca structură și funcție, dar diversitatea compoziției chimice exclude originea lor comună.

Archaea cu alte tipuri de înveliș celular reacționează Gram negativ, dar structura tipică de perete Gram negativ lipsește.

2.1.5. Funcțiile peretelui celular

Peretele celular este o structură esențială a celulei bacteriene, îndeplinind funcții multiple:

– este o structură cu rol esențial în *arhitectura celulară*, pentru că fiind rigid, determină forma celulei și menținerea ei. După pierderea conținutului celular, sacul mureinic

BCU INSTITUTUL CENTRAL UNIVERSITAR LIBRARY

păstrează forma inițială a celulei. Mureina conferă *elasticitate* celulei, permițând mărirea volumului ei prin creștere. Elasticitatea este capacitatea de a suferi deformări la presiune, fără alterarea structurii celulare.
- conferă protecția față de liza osmotică în mediile hipotonice;
- peretele celular reglează funcția de permeabilitate, constituind o barieră mecanică suplimentară, alături de membrana citoplasmatică. La bacteriile Gram pozitive, peretele are o porozitate de 1,1 nm, permițând trecerea moleculelor mai mici de 1200 Da*.

* Un dalton este egal cu masa atomului de H, adică $1{,}672649 \times 10^{-24}$ g. 1 kDa = 1 000 Da.

- la bacteriile *Gram pozitive*, peretele participă la formarea *septului de diviziune*, care separă cele două celule surori, și la procesele de creștere. Creșterea volumului celular este rezultatul creșterii peretelui;
- la bacteriile Gram negative membrana externă conține proteine cu funcții de *transport molecular*, care au rol de receptori de vitamine, glucide, aminoacizi, de transferine (leagă Fe și îl transferă în celulă);
- membrana externă este o barieră cu permeabilitate selectivă: permite difuzia moleculelor mici în ambele sensuri, fiind impermeabilă pentru macromolecule. Permite difuzia limitată a substanțelor hidrofobe, deoarece lama externă nu conține glicerofosfolipide. Suprafața celulei este acoperită cu LPS, care formează o structură quasicristalină. Din această cauză, lama externă nu prezintă o difuzie laterală marcată a moleculelor, tipică membranelor alcătuite din glicerofosfolipide;
- *porinele* membranei externe, legate necovalent de mureină, reglează procesele de permeabilitate prin modificări conformaționale, deoarece funcționează ca adevărate canale moleculare. În mediile cu osmolaritate mică (cele naturale), porinele sunt mai permeabile, iar la bacteriile patogene, în organismul gazdă, porinele au permeabilitate mai mică;
- la bacteriile patogene, în membrana externă se găsesc proteine de virulență: *adezine*, cu rol de fixare a bacteriei pe celulele sensibile;
- LPS are proprietăți *chimiotactic negative* față de fagocite, mărind nivelul virulenței bacteriene și conferă individualitate biochimică și serologică diferitelor tulpini;
- LPS este *antigenic* și induce sinteza anticorpilor specifici cu rol protector.

2.1.6. Protoplaștii bacterieni

Protoplastul este structura organizată a componentelor celulare care ramâne după îndepărtarea peretelui celular și care, păstrându-și viabilitatea realizează procese metabolice, biosinteze și transfer de energie (fig. 9).

Protoplaștii bacterieni au fost obținuți experimental în 1952 de către Salton. El a evidențiat că peretele celular de *Micrococcus lysodeikticus* s-a digerat sub acțiunea lizozimului.

Cea mai folosită metodă de obținere a protoplaștilor este digestia enzimatică cu lizozim a peretelui bacteriilor Gram pozitive. Lizozimul, care se găsește în lacrimi, salivă, albușul de ou, atacă mureina (peptidoglicanul) prin hidroliza legăturilor β 1–4 ale lanțurilor polizaharidice. Rezultă un dizaharid format din N-acetilglucozamină și N-acetilmuramic, la care rămân atașate catenele peptidice.

Protoplastul este foarte sensibil la liza osmotică. Citoplasma celulei bacteriene este o soluție mai

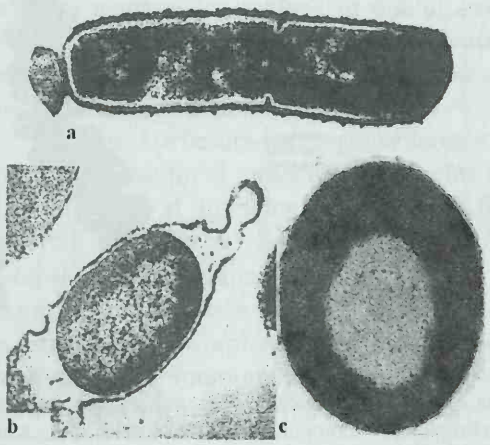


Fig. 9. Imaginea electrono-optică a celulelor de *Bacillus subtilis*. a. În regiunea centrală s-a inițiat formarea septului de diviziune. b. Un stadiu intermediar al degradării peretelui sub acțiunea lizozimului și retracția protoplastului. c. Protoplastul (Mihăescu și colab., 1991).

BUCAREST UNIVERSITY LIBRARY

concentrată (l0 mM) decât a mediului de suspensie. Apa trece din compartimentul cu concentrație mică în cel cu concentrație crescută, printr-un proces denumit *osmoză*. Într-un mediu neprotejat osmotic, apa pătrunde în protoplast şi se produce *plasmoliza*.

Într-un mediu protejat osmotic, protoplaştii celulelor Gram pozitive îşi păstrează integritatea structurală, capacitatea respiratorie, de biosinteză, de creştere şi diviziune şi chiar de replicare a fagului, dacă infecția s-a făcut înainte de îndepărtarea peretelui.

Mediul de protecție osmotică (de protoplastizare) trebuie să conțină o concentrație mare a unor substanțe pentru care membrana celulară este impermeabilă (soluție de sucroză 0,3 M). Dacă mediul de suspensie este hipertonic, protoplastul pierde apa şi colapsează, proces denumit *plasmoptiză*.

În condiții speciale de mediu, protoplastul îşi regenerează peretele şi revine la forma originală a celulei, proces denumit *reversie*. Regenerarea este sigură dacă protoplastul mai păstrează un rest de perete, care va funcționa ca primer al resintezei structurii parietale.

Tratamentul cu lizozim nu este eficient pentru conversia bacteriilor Gram negative la protoplaşti, datorită membranei externe care împiedică accesul enzimei la peptidoglican. Pentru creşterea eficienței acțiunii enzimatice, celulele se tratează cu EDTA, care diminuează concentrația ionilor de Mg. Se formează *sferoplaşti* (celule sferice înconjurate parțial sau total de membrana externă).

2.2. Membrana plasmatică

Membrana plasmatică sau plasmalema (*lemma*, lb. greacă = peliculă) este bariera separatoare a citoplasmei de mediul extern. Consecința imediată a lezării membranei este pierderea componentelor citoplasmatice.

2.2.1. Structura membranei plasmatice

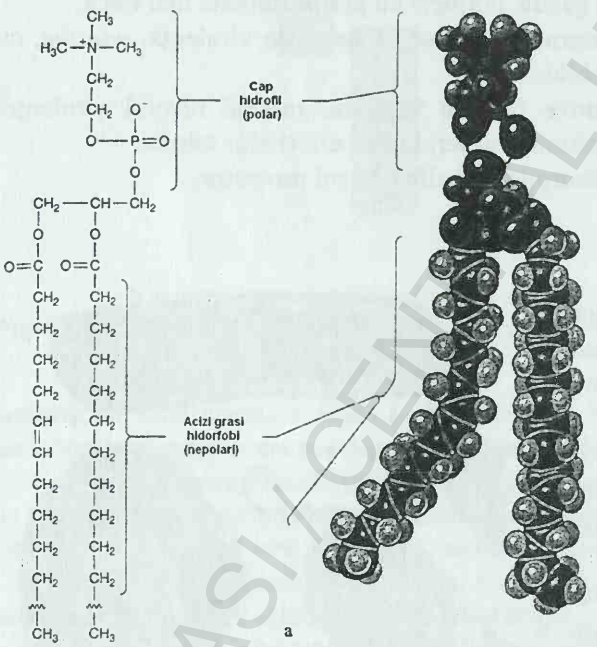


Fig. 10. a. Reprezentarea schematică a moleculei fosfolipidice, componenta structurală a membranei. Fosfolipidele sunt molecule polare. „Cozile" de acizi graşi sunt foarte hidrofobe (nu formează legături cu apa) şi constituie o barieră de permeabilitate față de moleculele hidrosolubile. „Capul" moleculei este format din gruparea fosfat, legată de o grupare care conține N şi din glicerol. Este foarte hidrofil (formează legături cu moleculele de apă).

Grosimea membranei este de 7–10 nm. La microscopul electronic are o structură *trilaminară*, după modelul unitar al membranelor celulare (*unit membrane*) al lui Robertson. Pe baza structurii fine s-a considerat (eronat) că membrana plasmatică este alcătuită din două straturi de proteine, între care se găseşte unul lipidic, dar cantitatea de proteine este prea mică pentru a forma două straturi continue.

Membrana celulei procariote conține proteine, glucide şi lipide, dar spre deosebire de membrana celulei eucariote, cu puține excepții, nu conține steroli (fig. 10a).

Singer şi Nicolson au propus modelul *mozaicului fluid* (fig. 10b) de organizare a membranelor biologice, care consideră că membranele sunt *structuri bidimensionale de proteine globulare şi lipide*, cu distribuție orientată, stabilizate de cea de a III-a componentă majoră – *apa*. Moleculele de apă sunt legate prin punți intermoleculare de H, formând o structură de *rețea*. Dizolvarea unei molecule în apă semnifică stabilirea unei continuități între structura chimică a moleculei dizolvate şi structura de rețea a apei. Pentru a se integra (dizolva) în structura de rețea a apei, molecula trebuie să formeze o legătură de H cu apa sau să accepte o legătură a acesteia.

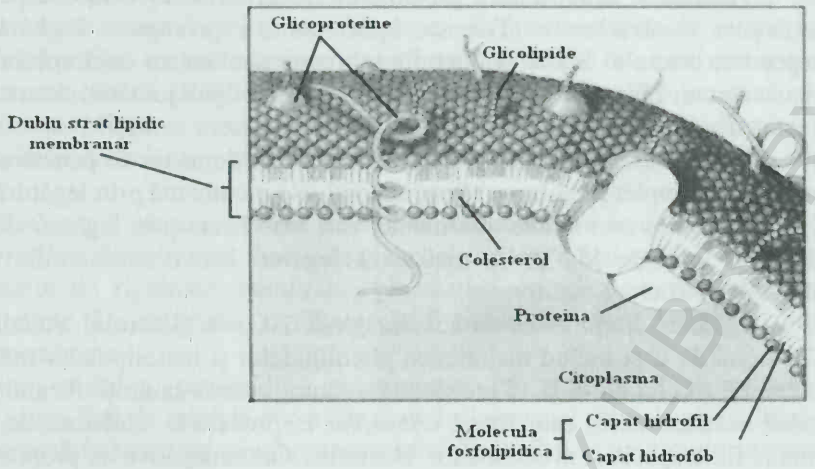


Fig. 10b. Modelul mozaicului fluid al structurii membranei. Fosfolipidele formează un strat dublu, cu componentele hidrofobe orientate spre interior, iar capetele hidrofile constituie suprafața internă și externă a membranei. În „marea" lipidică proteinele plutesc ca niște "iceberg-uri". Unele se extind în toată grosimea dublului strat lipidic, iar altele sunt ancorate pe fața internă sau externă. Membrana micoplasmelor și eucariotelor conține colesterol.

Membrana este un dublu strat fosfolipidic și glicolipidic foarte subțire (bidimensional), la care se asociază proteinele membranare. Ansamblul molecular al membranei este asemănat cu un ocean fosfolipidic, în care plutesc ca niște *iceberg*-uri, proteinele.

Proteinele conferă membranelor multe dintre proprietățile funcționale specifice (de exemplu, menținerea și utilizarea gradientului transmembranar de H pentru sinteza ATP).

În raport cu dispunerea lor în structura membranei, proteinele sunt *periferice* și *integrate.*

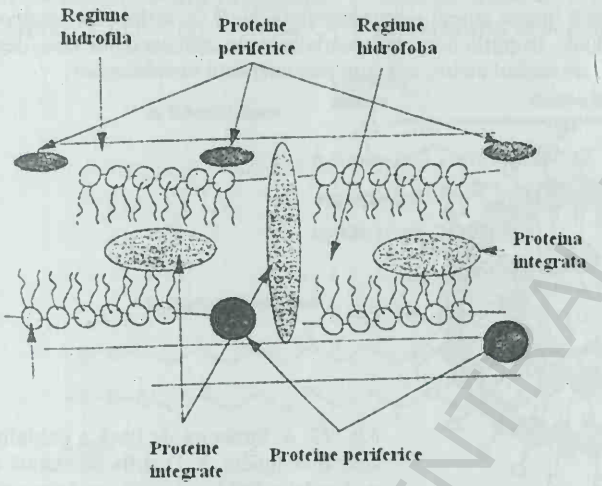


Fig. 11. Reprezentarea schematică a localizării proteinelor membranare. Proteinele periferice sunt în raporturi spațiale strânse cu capetele hidrofile ale fosfolipidelor. Proteinele integrate sunt localizate în dublul strat fosfolipidic ori au domenii care se extind în regiunile hidrofile (dupa Holt si colab., 1998),

Proteinele *periferice* sunt asociate cu membrana, dar nu au nici o secvență inclusă în structura ei. Structura lor este analogă proteinelor hidrosolubile.

Proteinele membranare *integrate* au cel puțin un *domeniu al moleculei situat în regiunea hidrofobă* a stratului lipidic. Ele pot fi dislocate din structura membranei numai sub acțiunea detergenților ce solubilizează lipidele.

Clasa proteinelor *integrate* se împarte în două subclase:

1. *Proteinele transmembranare* au o mare parte a masei lor inclusă în dublul strat fosfolipidic, dar expun domenii semnificativ diferite pe ambele fețe ale membranei, ceea ce conferă asimetria funcțională a acesteia.

Ele au o structură heterogenă, deoarece cel puțin un domeniu al moleculei este inclus în mediul *hidrofob* al lipidelor și trebuie să fie compatibil cu acesta. Secvența de 19–23 aminoacizi a domeniului inclus în stratul lipidic este *hidrofobă* și are configurația α-helix (fig. 11).

Domeniile extralipidice ale proteinelor integrate sunt *hidrofile**, ceea ce conferă *asimetria structurală* și *funcțională* a membranei. Proteinele integrate difuzează liber în planul lateral al matricei lipidice, dar nu trec liber dintr-un strat în altul și de aceea asimetria funcțională a membranei se păstrează pentru perioade lungi. Așa se explică permeabilitatea superioară a feței interne în raport cu fața externă.

* Biomoleculele sunt amfipatice, adică posedă regiuni bogate în grupări încărcate electric (polare), precum și regiuni hidrofobe (nepolare). Grupările polare conțin atomi de O, S sau N, ce acționează ca acceptori de legături de H prin intermediul cărora interacționează cu alte grupări de semn opus sau cu apa ca solvent. Apa este o moleculă foarte polarizată, având sarcini pozitive și negative. Moleculele ce poartă grupări electrostatice, ca NH_3 și COO^- sunt polare și greu de separat din apă. Proteinele se pliază cu resturile de aminoacizi hidrofobi, spre interior, iar aminoacizii cu grupări polare (Arg, Glu, Ser) se găsesc la suprafața moleculei.

Asimetria structurală a proteinelor integrate se evidențiază pe imagini electrono-optice ale membranei criofracturate. Tehnica criofracturării presupune înghețarea rapidă a membranei la temperatura azotului lichid şi fracturarea membranei cu un cuțit special. Membrana se clivează de-a lungul regiunii hidrofobe a acizilor graşi şi rezultă două jumătăți de membrană, cu un grad accentuat de asimetrie, conferită de proteinele transmembranare.

2. *Proteinele membranare ancorate* au un domeniu ce penetrează dublul strat lipidic, dar nu traversează complet membrana. Sunt ancorate de membrană prin legătură covalentă cu lipidele.

Structura membranei plasmatice este stabilizată prin legături de H şi interacțiuni moleculare hidrofobe. Ionii de Mg şi Ca realizează legături ionice cu sarcinile negative ale fosfolipidelor şi stabilizează structura membranei.

Lipidele conțin esteri ai acizilor graşi (AG) cu glicerolul. Acizii graşi celulari au o catenă de 9–20 atomi de C şi includ majoritatea glicolipidelor şi fosfolipidelor membranare, în a căror structură predomină AG cu l4, l6 şi 18 atomi de C, saturați sau nesaturați. Acidul gras saturat cu 16 atomi de C (acidul hexadecanoic) este foarte conservat la procariote. Eubacteriile conțin circa 20 de AG, unii dintre ei fiind specifici procariotelor. Bacteriile Gram negative au proporție mai mare de AG saturați şi mononesaturați, cu număr par de atomi de C, decât cele Gram pozitive (Magnuson şi colab., 1993). Ultimele au o proporție mai mare de AG cu număr impar de atomi de C. În categoria acizilor graşi nu sunt incluse catenele lungi de 24–90 atomi de C ai acizilor micolici şi nici quinonele izoprenoide.

Fosfolipidele (fosfogliceride) membranelor biologice sunt molecule *amfipatice polare*, deoarece au un *cap polar* (glicerolul) legat cu *cozile nepolare** ale acizilor graşi: *glicerolul* intră în structura de rețea a apei, fiind *hidrofil*, iar *acizii graşi* formează componenta *hidrofobă* a moleculei (fig. 12). Astfel, membrana are două suprafețe polare, cu caracter hidrofil, datorat resturilor de glicerol.

* O moleculă sau un grup de atomi este nepolar dacă îi lipsesc atomii electronegativi – N, O, S, astfel că nu conține grupări cu sarcini electrostatice importante: steroizii şi alte lipide, lanțurile lungi hidrocarbonate ale aminoacizilor Leu, Ileu, Val. Moleculele nepolare au tendința de a se deplasa din apă spre mediul uleios, aşa cum este interiorul membranelor.

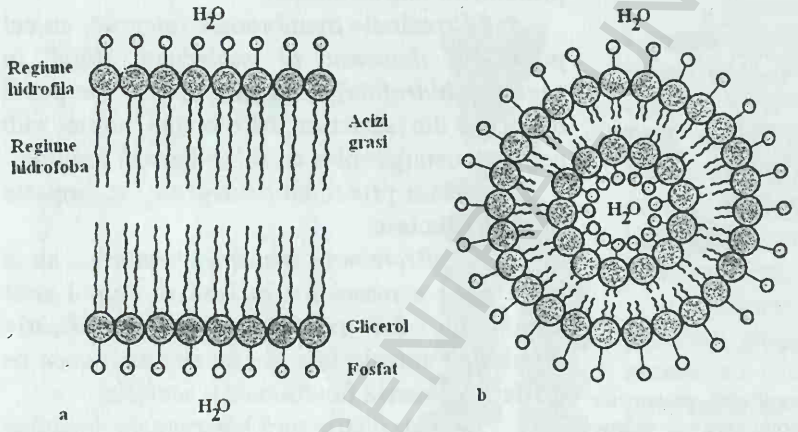


Fig. 12. a. Structura de bază a dublului strat fosfolipidic. *b.* Distribuția stabilă a moleculelor lipidice în apă, cu formarea unei vezicule membranare.

Rolul lipidelor membranare s-a studiat folosind ca model veziculele membranare artificiale sau naturale, ce se formează spontan după spargerea celulelor. În soluție apoasă, lipidele se agregă şi formează spontan structuri în dublu strat: micelii** sferice cu acizii graşi la interior, iar moleculele de glicerol ramân expuse în mediul apos. Miceliile se organizează asemănător în mediul hidrofob (uleios), dar componenta apolară (hidrofobă) se orientează spre mediul de dispersie. Agregatul funcționează ca o barieră impermeabilă pentru trecerea liberă a moleculelor polare în şi din celulă.

** Miceliile sunt particule formate din câteva mii de macromolecule *amfipatice* şi apă. Moleculele amfipatice au o grupare carboxil polară şi o catenă lungă apolară (de exemplu, acizi graşi) şi sunt orientate cu regiunea hidrofobă spre interior, de unde apa este exclusă, iar grupările hidrofile sunt orientate la suprafață, în contact cu apa.

Al II-lea tip de agregat lipidic în apă este dublul strat, în care cele două straturi lipidice formează o lamă bidimensională (fig. 12a). Regiunile hidrofobe ale fiecărui monostrat interacționează reciproc, dar la capete sunt în contact cu apa. Lama dublului strat este relativ instabilă, se pliază şi formează al III-lea tip de agregat, o sferă (veziculă), un liposom, care delimitează un compartiment apos (fig. 12b).

Datorită caracterului hidrofob, deplasarea lipidelor dintr-un strat în altul (mişcare flip-flop) necesită ca un grup polar să părăsească mediul apos şi să se deplaseze în interiorul hidrofob al dublului strat, proces care presupune schimbări majore ale energiei libere. În timpul sintezei membranei bacteriene (ca şi în celulele eucariote), fosfolipidele sunt produse pe faţa internă a membranei şi trebuie să difuzeze în lama externă. Mişcarea transmembranară este facilitată de o familie de proteine (flipaze), care oferă o modalitate de mişcare mai favorabilă energetic şi mult mai rapidă decât mişcarea necatalizată.

Cu excepţia *micoplasmelor* şi a *metanotrofelor*, membrana procariotelor se deosebeşte de cea a eucariotelor prin absenţa *sterolilor*. Sterolii sunt molecule plane, rigide, iar acizii graşi sunt flexibili. Sterolii conferă un grad superior de rigiditate membranei plasmatice. Rigiditatea membranei este necesară celulelor lipsite de perete. La eucariote, rigiditatea ar fi necesară pentru a suporta forţele fizice care se exercită asupra membranei.

Antibioticele polienice (nistatin, candicidin) reacţionează cu sterolii şi destabilizează membrana. De aceea ele sunt active faţă de celulele eucariote şi nu influenţează celulele procariote.

Micoplasmele încorporează în structura membranei *sterolul* disponibil în mediul de creştere şi sunt sensibile la antibioticele polienice.

La unele bacterii, în structura membranei se găsesc molecule asemănătoare structural cu colesterolul care pot avea acelaşi rol de creştere a rigidităţii: *hopanoidele*. Un compus cu distribuţie largă este diploptenul, cu 30 atomi de C.

Membrana citoplasmatică la *Archaea* are o structură electrono-optică trilaminară, dar din punct de vedere chimic este unică prin natura lipidelor.

Lipidele eubacteriilor şi eucariotelor sunt esteri ai acizilor graşi cu glicerolul. Lipidele *Archaea nu conţin acizi graşi* şi sunt de două tipuri: *glicerol-dieteri* şi *diglicerol-tetraeteri*, cu catene izoprenoidice (fig. 13). La C_3 al glicerolului se leagă o grupare *fosfat, sulfat* sau un rest *glucidic*.

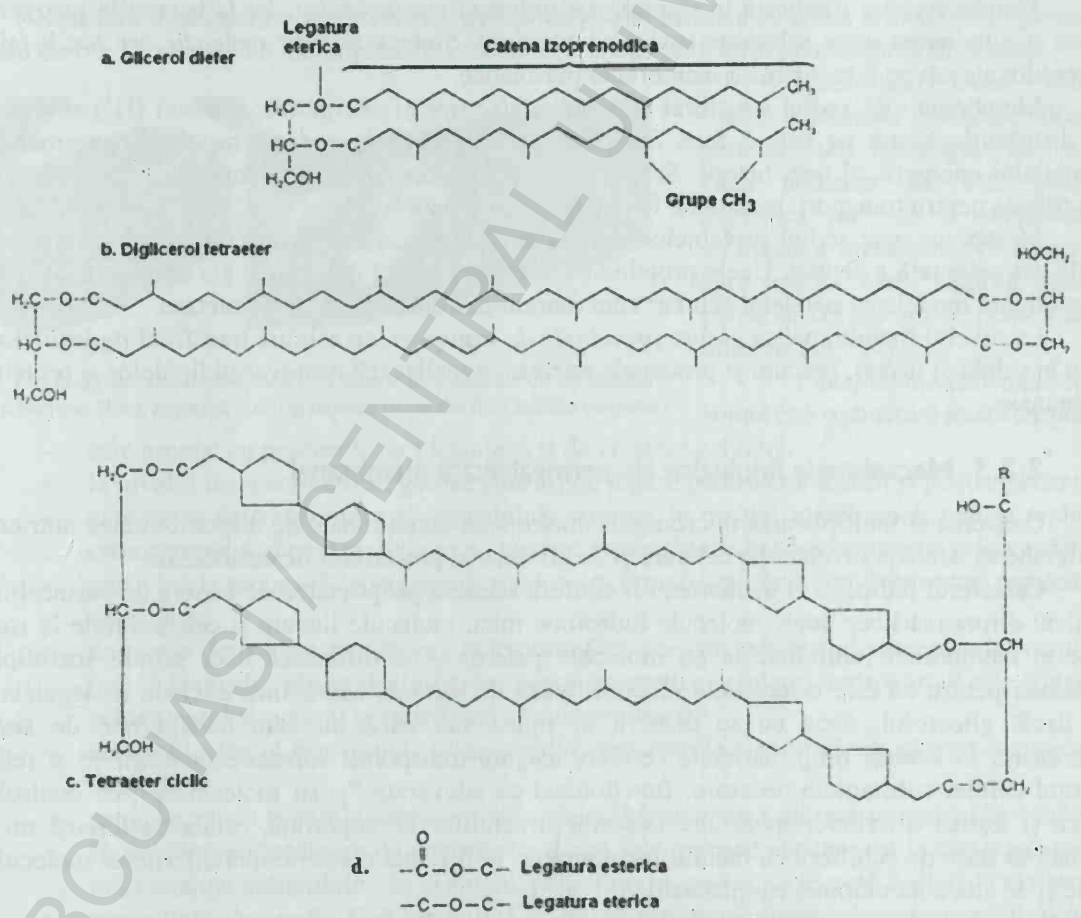


Fig. 13. Lipidele majore la *Archaea*. a. Glicerol dieterii. b. Diglicerol-tetraeteri cu catena lineară. c. Diglicerol-tetraeteri cu 4 inele pentaciclice. d. Catena de C este ataşată totdeauna de glicerol prin legături *eter*.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Catenele izoprenoidice au între 15 şi 40 atomi de C. Membrana plasmatică la *Archaea* are două suprafeţe polare, cea internă şi cea externă, datorită resturilor de glicerol, iar interiorul este hidrofob, ca şi la celelalte membrane, dar nu conţine fosfolipide.

Glicerol-dieterii formează stratul dublu lipidic, prezent în structura membranelor celulare. La unele *Archaea* predomină net diglicerol-tetraeterii şi membrana este formată dintr-un *monostrat lipidic*. Diglicerol-tetraeterii sunt echivalentul chimic al dublului strat lipidic, dar diferenţa constă în faptul că cele două straturi sunt legate covalent.

Glicerol-dieterii au catene laterale izoprenoidice de 20 atomi de C, iar diglicerol-tetraeterii au catene laterale de 40 atomi de C. La unele *Archaea*, catenele de C ale diglicerol-tetraeterilor sunt complicate prin existenţa a 4 inele pentaciclice, dar se păstrează lungimea de 40 de atomi de C.

Glicerol-eterii sunt markeri biochimici ai *Archaea*.

2.2.2. Funcţiile membranei plasmatice

Membrana plasmatică este bariera majoră structurală şi de permeabilitate între mediul celular şi cel extern. Membrana este în primul rând bariera de permeabilitate care împiedică difuzia liberă a componentelor citoplasmatice. Permeabilitatea foarte selectivă este asigurată de *asimetria sa funcţională*: este mai permeabilă pe faţa internă, ceea ce asigură menţinerea constanţei mediului intern faţă de cel extern, foarte variabil.

Membrana este sediul *sinergonului respirator* (constituenţii moleculari care realizează procesele de respiraţie celulară şi formează sistemul de transport al electronilor) şi al *sinergonului fotosintetizant*. Dovada structurală a rolului membranei ca suport structural al sinergonului respirator este faptul că la *Azotobacter*, care are cea mai înaltă rată respiratorie, membrana îşi măreşte adaptativ suprafaţa formând numeroase intruzii veziculare.

Membrana este implicată în sinteza şi eliminarea *exoenzimelor*, iar la bacteriile patogene, în sinteza si eliminarea unor substanţe toxice (exotoxine). Sinteza acestor molecule are loc la nivelul ribosomilor ataşaţi pe faţa internă a membranei plasmatice.

Membrana este sediul structural al *sarcinii electrice şi energetice*: protonii (H^+) şi ionii OH^- sunt distribuiţi separat pe cele 2 feţe. Se generează o formă de energie metabolică asemănătoare potenţialului energetic al unei baterii. Starea energetică a membranei denumită *forţă proton-motrice* este utilizată pentru transport, mobilitate flagelară şi biosinteza ATP.

Membrana este sediul proteinelor cu rol de *chemoreceptori*, în special a celor ce au rol în mobilitatea orientată a celulei. Unele proteine membranare au rol de enzime ale sistemului ATP-azic. Altele asigură modelarea peretelui celular: sunt murein-hidrolaze şi murein-sintetaze.

La nivelul membranei se găsesc *proteinele de transport*, ce asigură transferul moleculelor din mediu în celulă şi invers, precum şi proteinele enzime ce realizează *turnover*-ul lipidelor şi proteinelor membranare.

2.2.3. Mecanismele fiziologice ale permeabilităţii membranei

Creşterea şi multiplicarea microorganismelor sunt condiţionate de disponibilitatea nutrienţilor care trebuie să străbată învelişurile celulare şi de eliminarea produselor de catabolism.

Caracterul hidrofob al membranei îi conferă acesteia proprietatea de barieră de permeabilitate selectivă: difuzează liber unele molecule hidrofobe mici, molecule lineare şi cele solubile în mediul lipidic al membranei (antibioticele cu molecula polară). Apa difuzează liber printre fosfolipidele membranei pentru că este o moleculă mică şi lipsită de sarcină. Membrana exclude moleculele mai mari decât glicerolul, dacă nu se dizolvă în lipide sau dacă nu sunt transportate de sisteme membranare. În acelaşi timp, barierele celulare asigură transportul substanţelor nutritive şi reţin în interiorul celulei substanţele necesare, funcţionând ca adevărate "porţi moleculare", ce controlează intrarea şi ieşirea diferitelor molecule. Datorită structurilor de suprafaţă, celula bacteriană nu este niciodată în stare de echilibru cu mediul înconjurător, în privinţa concentraţiei diferitelor molecule de o parte şi de alta a membranei citoplasmatice.

În funcţie de mecanismele fizico-chimice care stau la baza lor, transportul moleculelor (electroliţi şi neelectroliţi) prin membrană se face prin două categorii de procese fiziologice:

– difuzia pasivă
– mecanismele de transfer cu moleculă purtător (Maloney şi colab, 1990; Fath şi Colter, 1993; Paulsen şi colab., 1996).

2.3. Mezosomul

Mezosomul (sau corpul din mijloc) este o structură derivată din membrană, a cărei poziţie în celulă este adesea mediană. Se mai numeşte *plasmalemasom* (corp derivat din membrană).

Pentru ca o structură membranară să poată fi încadrată în categoria mezosomilor trebuie să îndeplinească trei condiţii de bază:

– să derive din membrana citoplasmatică, adică să fie rezultatul unor intruzii ale membranei citoplasmatice, cu care structura mezosomală păstrează permanent legături de continuitate directă;
– să poată fi extruzată în spaţiul dintre membrana plasmatică şi peretele celular, prin creşterea presiunii osmotice a mediului de suspensie;
– să fie asociată cu următoarele procese importante ale celulei:
  a) cu replicarea cromosomului şi cu distribuţia celor doi cromosomi în celulele surori;
  b) cu procesul de sporulare.

S-au descris trei tipuri morfologice de mezosomi: *tubulari, veziculari şi lamelari*. Unii autori consideră că aceste forme sunt reciproc reversibile, realizând un continuum structural.

Mezosomii sunt mai frecvenţi şi au o structură mai complexă, de tip lamelar, la bacteriile Gram pozitive. La cele Gram negative sunt mai rari şi au aspect tubular.

În mediile hipertonice, mezosomii se extruzează în spaţiul dintre membrana citoplasmatică şi peretele celular, ca o dovadă certă a legăturii lor structurale directe cu membrana plasmatică.

Structura moleculară a membranelor mezosomale este identică cu aceea a membranei plasmatice din care derivă: un strat dublu fosfolipidic, în care sunt inclavate proteinele structurale şi enzimatice.

a b

Fig. 14. Imagine electrono-optică a structurii mezosomale de tip tubular (a) la o bacterie Gram negativă şi de tip lamelar (b) la *Bacillus subtilis* (original).

Mezosomii sunt structuri foarte dinamice, prezente doar în anumite stări fiziologice ale celulei, când prezenţa lor este necesară. Formarea lor este o modalitate de extindere a membranei citoplasmatice spre interior care, datorită rigidităţii peretelui celular nu se poate mări pe altă cale (fig. 14).

Funcţiile mezosomului. Mezosomul este o structură multifuncţională:

– este asociat cu procesele de biosinteză şi de creştere celulară;
– la nivelul mezosomului se găsesc situsuri de legare pentru cromosom şi pentru plasmide;
– este calea de transmitere a semnalului, originar la nivelul membranei, pentru replicarea cromosomului şi pentru diviziune, după ce dimensiunile celulei au atins o valoare critică;
– participă la procesul de segregare a celor doi cromosomi între celulele surori rezultate din diviziune;
– deoarece derivă din membrană şi împreună cu aceasta este sediul *sinergonului respirator* (adică la nivelul său se desfăşoară procese energetice celulare), mezosomul este considerat echivalentul structural şi funcţional al mitocondriei;
– este echivalentul funcţional al *lizosomului*, deoarece la nivelul său se găsesc enzime cu rol degradativ;
– este asociat cu funcţiile secretorii ale celulei. Mezosomii sunt mai numeroşi în celulele de *B. subtilis* producătoare de enzime. Participă într-un mod necunoscut la sinteza şi secreţia unor enzime inductibile (de exemplu, penicilinaza, pe care o secretă bacteriile rezistente la penicilină). În mediu fără penicilină nu se secretă penicilinaza şi mezosomii lipsesc, dar apar în celulele care cresc pe mediul ce conţine penicilină.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2.4. Citoplasma

Citoplasma celulei bacteriene este un sistem complex reprezentat de soluție propriu-zisă*, de soluție coloidală**, de emulsie*** și de micele****, format din proteine, glucide, apă și substanțe minerale.

* Soluțiile adevărate sunt formate de moleculele mici dizolvate într-un solvent. Moleculele dizolvate nu se pot distinge prin metode fizice de moleculele solventului. Ele conferă soluției (citoplasmei) *presiune osmotică*.

** Soluțiile coloidale sunt formate de moleculele mari, cu dimensiuni între 1–100 nm: soluțiile coloidale sunt opalescente și absorb o parte a razelor de lumină care le străbate lateral.

*** Emulsia este o suspensie de picături mici ale unui lichid în alt lichid, cu care nu este miscibil.

**** Micelele sunt particule formate din macromolecule *amfipatice* și apă. Moleculele amfipatice au o grupare carboxil polară și o catenă lungă apolară (de exemplu, acizi grași).

Electroliții sunt în concentrație mare și sunt reținuți în citoplasmă datorită permeabilității selective a membranei. Concentrația mare a substanțelor dizolvate – organice și anorganice, generează o presiune hidrostatică sau *presiune de turgor*, ce se manifestă în raport cu fața internă a membranei.

* Presiunea de turgor este diferența de presiune osmotică între mediul citoplasmatic și mediul extracelular.

Cele 4 stări fizice ale citoplasmei sunt într-o continuă modificare a raportului lor cantitativ, care în ansamblu, datorită lipsei curenților citoplasmatici, conferă caracterul unui *gel fluid*.

Caracterul de gel al citoplasmei este consecința *stării apei*. Molecula de apă este un *ion dipolar* (zwitterion). O moleculă dipolară are simultan un grup încărcat pozitiv și un grup încărcat negativ (aminoacizii individuali, dar și moleculele proteice au o grupare cu sarcină pozitivă (NH_2^+) și o grupare încărcată negativ (COO^-) Proprietatea de polaritate a apei este foarte importantă, deoarece este mediul în care se dizolvă multe molecule polare. Apa formează o rețea tridimensională atât cu ea însăși, cât și cu macromoleculele. Polaritatea înaltă a moleculei de apă face ca moleculele nepolare să formeze agregate stabile. Faptul că moleculele de apă sunt legate în rețea condiționează proprietățile sale de solvent, tensiunea superficială* înaltă și căldura specifică înaltă.

* Tensiunea superficială este forța elastică ce se manifestă la suprafața unui lichid, ce tinde să se micșoreze la un minim posibil în contact cu aerul.

În celulă, apa se găsește în două stări:

- *apa liberă* este cea care se deplasează liber în celulă și care la creșterea presiunii osmotice a mediului extracelular trece în afara celulei;
- *apa legată* (de hidratare) în structura gelului citoplasmatic.

În celula bacteriană vegetativă, apa liberă (care constituie circa 70% din totalul apei) creează un mediu de suspensie pentru macromolecule.

Apa liberă este foarte *mobilă*, iar cea din structura gelului este practic imobilă. Starea de gel a citoplasmei păstrează componentele celulare separate spațial (Wiggins, 1990).

Absența curenților citoplasmatici are ca rezultat imobilitatea conținutului celular.

La celulele bacteriene tinere, aflate în faza logaritmică de creștere, citoplasma este fin granulară, densă și omogenă, intens *bazofilă*, datorită conținutului ridicat de acizi nucleici. ARN citoplasmatic este reprezentat de ARNr (80%), ARNt (10–20%) și ARNm (2%).

În citoplasma celulelor tinere se găsesc, într-o proporție mare, proteinele-factori de creștere implicate în sinteza noilor proteine.

În citoplasma celulelor îmbătrânite apar materiale de incluzie și vacuole. Aspectul devine granular neomogen, iar bazofilia se diminuează datorită scăderii până la 0 a ratei sintezei ARN, precum și datorită reducerii treptate a cantității existente. Afinitatea pentru coloranții bazici este neuniformă.

2.5. Nucleoidul bacterian

Aparatul genetic bacterian este reprezentat de două tipuri de structuri: *nucleoidul*, care din punct de vedere structural şi funcţional corespunde *cromosomului* şi *plasmidele*. Corespunzător celor două tipuri de structuri, determinanţii genetici sunt de două categorii: *gene esenţiale* (eucromosomale), localizate în structura cromosomului şi *genele accesorii*, cu localizare plasmidială sau în structura elementelor genetice transpozabile şi a unor fagi.

Cromosomul bacterian, ca structură genetică esenţială, poartă informaţia genetică ce asigură desfăşurarea funcţiilor esenţiale pentru existenţa celulei, adică setul de determinanţi minim necesari pentru a codifica arhitectura celulei şi pentru a asigura metabolismul energetic şi de biosinteză, creşterea, diviziunea şi reglarea diferitelor activităţi celulare.

Structurile genetice extracromosomale (plasmidele) poartă informaţia genetică accesorie, "de confort", care permite celulei o mai bună adaptare la condiţii de mediu noi sau modificate.

Genomul *E. coli* K_{12} este alcătuit din circa 4400 de gene. Pentru creşterea în laborator ar fi necesare numai câteva sute. Genomul este rezultatul acţiunii forţelor selective pentru eficienţă metabolică şi adaptabilitate.

Spre deosebire de celulele eucariote care au un nucleu cu structură bine definită, delimitat de o membrană şi conţinând un număr definit de cromosomi, "nucleul" bacterian reprezintă o formă primitivă de organizare, lipsită de membrană, inclavată direct în citoplasmă. Particularitatea structurii nucleare – lipsa membranei delimitante – este fundamentală pentru organizarea celulară de tip *procariot*, căreia îi aparţin bacteriile.

Datorită caracterelor structurale particulare, "nucleul" bacterian a primit diferite denumiri: *nucleoid, material nuclear, nucleoplasmă, echivalent nuclear* sau chiar *nucleu,* prin analogie cu nucleul celulei eucariote, *lineom* sau *genofor.*

Pe micrografiile electrono-optice, materialul nuclear este localizat, în mod obişnuit, în partea centrală a celulei şi se distinge de citoplasma înconjurătoare, prin densitatea sa mai mică la fluxul de electroni, în contrast cu celula eucariotă, la care nucleul este mai electronodens, comparativ cu citoplasma. Celula procariotă are un *contrast invers* al structurilor sale, în raport cu celula eucariotă, care se datorează atât faptului ca *ADN nu este asociat cu proteine*, cât şi *densităţii foarte mari a citoplasmei bacteriene.*

Fig. 15. Imagine electrono-optică a nucleoidului la *B. subtilis*, x 150.000 (original).

Pe secţiuni ultrafine, zona materialului nuclear este ocupată de *fibrile* fine, cu diametrul de 2,5 nm, uneori aranjate în şiruri ondulate, paralele, asemănătoare cu o jurubiţă de aţă (fig. 15) şi sunt sensibile la hidroliza cu DN-ază.

2.5.1. Organizarea fizică a cromosomului

Materialul nuclear poate fi izolat din celulă sub forma unui *corpuscul dens* şi compact. Corpusculul corespunde stării "împachetate" a cromosomului. După tratamentul moderat cu RN-ază şi proteaze, din structura compactă se izolează molecula de ADN sub forma *cromosomului circular închis covalent* (60%), ARNm, ARNt (30%) şi ARN-polimeraza (10%) (Robinow şi Kellenberger, 1994). Cromosomul are o lungime de 1400 μm şi diametrul de 2,5 nm, corespunzător diametrului moleculei de ADN dublu catenar. Circularitatea este o condiţie a existenţei sale. Sub această formă, molecula de ADN este rezistentă la acţiunea exonucleazelor citoplasmatice, active asupra moleculelor lineare de ADN. Cromosomul bacterian este cea mai mare moleculă biologică. Prin lungimea sa, molecula de ADN cromosomal depăşeşte de circa 1000 de ori lungimea celulei bacteriene.

Raportată la dimensiunile mici ale unei bacterii, molecula de ADN este supusă constrângerilor topologice* de *supraspiralizare (suprarăsucire)*, prin care este "împachetată" pentru a forma un corp compact de 1500 de ori mai mic (Krawiec şi Riley, 1990).

* Topologia este o ramură a matematicii care studiază proprietăţile corpurilor geometrice, proprietăţi care rămân nealterate după răsucirea sau contorsionarea lor.

Pentru a ocupa un volum atât de mic, molecula de ADN se împachetează după norme foarte riguroase, aşa încât, în orice moment, oricare dintre cele 3000–5000 de gene cromosomale, să fie accesibilă sistemelor celulare de transcriere şi traducere.

Moleculele de ARN au un rol esenţial în menţinerea stării compacte a ADN. S-au propus mai multe modele de împachetare a moleculei de ADN. Cel mai acceptat este acela propus de Pettijohn şi Hecht (1974), citaţi de Mathews, 1992, în acord cu care, împachetarea se face printr-un proces de *pliere si supraspiralizare* (formare de suprahelice). Se formează astfel o structură condensată, menţinută prin acţiunea asociată a proteinelor din nucleoid.

Modelul de împachetare prin pliere şi supraspiralizare încearcă să explice mecanismul molecular al drumului invers, de la structura circulară relaxată a macromoleculei de ADN, la arhitectura corpusculului dens existent în celulă.

Pentru împachetare, se consideră că molecula dublu catenară, circulară, iniţial *se pliază* în 40–60 de *domenii* egale. Punctele de pliere sunt determinate de molecule de *ARN nascente*, legate cu una dintre extremităţi de ARN-polimerază. Moleculele de ARNr şi ARNt, împreună cu ARN-polimeraza participă la formarea şi menţinerea domeniilor de pliere. Prin pliere, diametrul cromosomului scade la circa 30 μm. În interiorul fiecărui domeniu de pliere are loc un proces de *supraspiralizare.* Supraspiralizarea este o stare fizică în care molecula de ADN se pliază prin răsucire în jurul propriei axe (fig. 16).

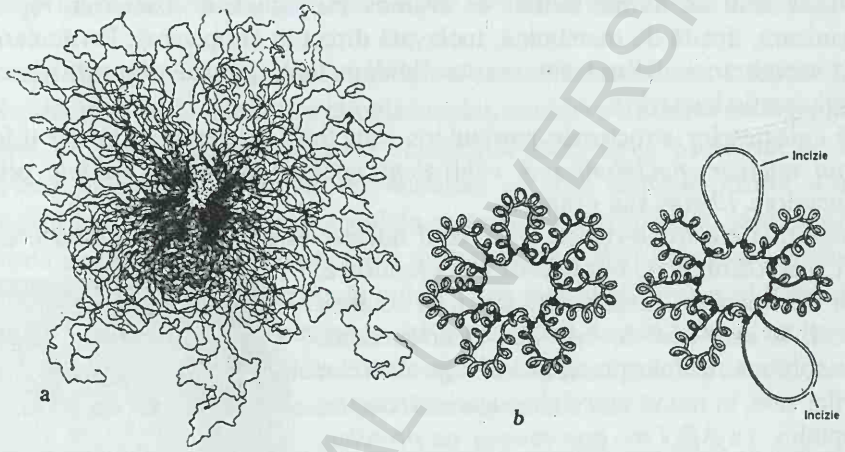


Fig. 16. Reprezentarea schematică a diferitelor stări fizice ale cromosomului bacterian. a. Bucle multiple de ADN dintr-o celulă spartă prin şoc hipotonic, răspândite pe suportul reprezentat de o proteină bazică. b. Diagrama ADN supraspiralizat. În stânga sunt reprezentate 7 domenii (numărul real este de circa 50) supraspiralizate, menţinute astfel de un set de proteine, care stabilizează capetele unui domeniu. Buclele mici ale fiecărui domeniu pot fi spiralizate în jurul unui set de proteine nucleosomale, reducând tensiunea în dublul helix, creată prin supraspiralizare. În dreapta, două domenii au fost incizate la nivelul unei catene, permiţând rotaţia helixului şi relaxarea supraspiralei (după Pettijohn şi Snider, 1985).

Într-o etapă ulterioară, domeniile suprahelicale se pliază din nou unul faţă de altul, superior şi inferior faţă de un plan orizontal. Astfel, rezultă masa compactă a nucleoidului, aşa cum se evidenţiază la microscopul optic şi se poate izola din celulă.

ADN bacterian, ca şi la eucariote este asociat cu proteine.

În celula eucariotă, corpii proteici în jurul cărora se spiralizează dubla catenă de ADN se numesc *nucleosomi*. La bacterii, organizarea moleculară a nucleosomilor este puţin cunoscută. Se pare că ei conţin două proteine de legare pentru ADN: proteina HU (*H*elix *U*nwinding) şi proteina I. Ele se găsesc în structura nucleosomului, în proporţia de o moleculă la 150–200 perechi de baze.

Bacteriile au o cantitate mică de ADN *neinformaţional*. Secvenţele repetate la bacterii pot fi:

- *homopolimerice* (multimeri ai uneia din cele 4 nucleotide: poli-A, poli-G, poli-T, poli-C), cu o lungime de până la 42 nucleotide;
- *secvenţe scurte de 2–6 baze.* Dacă sunt localizate în interiorul genelor şi au o secvenţă diferită de 3 sau 6 nucleotide, modifică potenţialul codificator al genei.
- *secvenţe mai lungi de 8 nucleotide*. La numeroase bacterii s-au evidenţiat câteva sute de secvenţe repetitive palindromice de 20–40 de baze, cu localizare extragenică, care delimitează unele gene şi a căror funcţie nu este cunoscută.

BCU "VASILE GOLDIŞ" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La bacterii nu s-au identificat gene înnădite. Comparând secvenţele genelor ce codifică proteine bine conservate în evoluţie, reiese că intronii au fost prezenţi în genele ancestrale, dar s-au pierdut în evoluţia organismelor mici, care şi-au redus la minimum cantitatea de ADN şi s-au adaptat la o creştere foarte rapidă (eubacterii şi levuri).

Genele bacteriene sunt strâns împachetate: se poate estima că circa 30% dintre ele se suprapun parţial cu genele învecinate.

În mod obişnuit, în celula bacteriană se găseşte un singur cromosom, dar în culturi tinere, pe medii care oferă condiţii optime de creştere, celulele apar multinucleate, având 2-4 cromosomi, identici genetic, deoarece provin prin replicarea cromosomului parental, astfel că, în esenţă, bacteriile sunt *organisme haploide*. Situaţia de celulă polinucleată este temporară şi este rezultatul lipsei de sincronizare între procesele de diviziune nucleară şi diviziune celulară.

Cromosomul bacterian este un singur *replicon*[*], deoarece se replică de la o singură origine.

2.6. Ribosomii

Ribosomii sunt particule ribonucleoproteice cu funcţie enzimatică ce catalizează formarea legăturilor peptidice, localizate în citoplasmă. La microscopul electronic au formă sferică, cu diametrul de 20 nm.

Pe baza constantei de sedimentare[*] (S) se disting următoarele categorii de ribosomi: a) *ribosomi 80 S*, în citoplasma celulelor eucariote; b) *ribosomi mitocondriali* şi *cloroplastici*, între 55 S la mamifere şi 75 S la plantele superioare; c) *ribosomii archaea*, de 70 S, asemănători din punct de vedere funcţional cu ribosomii 80 S ai eucariotelor, datorită absenţei sensibilităţii la streptomicină şi cloramfenicol şi prin sensibilitatea la toxina difterică; d) *ribosomii eubacteriilor*, de 70 S.

[*] Simbolul S semnifică *viteza de sedimentare a unei particule sau a unei molecule prin tehnica ultracentrifugării*. Unitatea Svedberg (inventatorul centrifugii) este unitatea de timp (de 1×10^{-13} secunde) în care sunt exprimaţi coeficienţii de sedimentare (valorile S) ai unei molecule într-un câmp gravitaţional. Viteza de sedimentare în câmpul gravitaţional este dependentă de două proprietăţi fizice ale moleculei:

– gr. mol. (M): cu cât gr. mol. creşte, cu atât creşte şi viteza de sedimentare;

– aspectul moleculei: o moleculă aerodinamică se deplasează mai repede decât una sferică. O moleculă mai compactă – întâmpină o forţă de frecare mai mică şi se deplasează mai repede.

Raportul dintre viteza de deplasare a moleculei şi forţa centrifugă aplicată se numeşte *coeficient de sedimentare (S)*.

S = Viteza/Forţa centrifugă

Valoarea lui S pentru o macromoleculă este aceiaşi în diferite soluţii, fiind cuprinsă, în funcţie de gr. mol., între 1×10^{-13} secunde şi 100×10^{-13} secunde.

Numărul ribosomilor în celula bacteriană este corelat cu activitatea ei fiziologică: este mic în celulele în repaus, dar creşte foarte mult în celulele fiziologic active (în medie 20000 ribosomi/celulă, cu variaţii între 15–10000).

Ribosomii sunt structuri *dinamice*, calitate ce se reflectă în capacitatea lor de a se disocia în două subunităţi, de 30 S şi 50 S şi de a se reasocia. Disocierea şi reasocierea sunt corelate cu variaţia concentraţiei ionilor de Mg: creşterea concentraţiei ionilor favorizează asocierea, iar scăderea concentraţiei lor produce disocierea. Circa 10% din numărul total de ribosomi sunt asamblaţi, liberi în citoplasmă. Ei sintetizează *proteinele structurale*. Alţi 10% se găsesc sub forma subunităţilor disociate, iar restul de 80% sunt *polisomi*.

Ribosomii au două localizări: liberi în citoplasmă sau ataşaţi feţei interne a membranei citoplasmatice. La nivelul celor ataşaţi se sintetizează proteinele de export.

Din punct de vedere biochimic, ribosomii bacterieni conţin circa 55 de tipuri de molecule proteice şi trei tipuri de molecule de ARNr. Ribosomul este un polianion mare (sarcinile negative conferite de grupările fosfat), deoarece ARN reprezintă 2/3 din componentele sale.

Studiile privind structura funcţională a ribosomilor s-au făcut cu două metode foarte sensibile: difracţia cu neutroni şi imunoelectronomicroscopia.

Subunitatea mică 30 S cuprinde (la *E. coli*), 21 tipuri de molecule proteice (S_1–S_{21}), în ordinea descreşterii mărimii, cu gr. mol. între 60 kDa şi 8 kDa şi o moleculă de *ARNr 16 S*, alcătuită din circa 1600 nucleotide.

Subunitatea mare, 50 S conține (la *E. coli*), 34 tipuri de molecule proteice (L_1 – L_{34}, L = *L*arge), cu gr. mol. cuprinsă între 9–28,5 kDa şi două molecule de *ARNr*, de *23 S* (2900 nucleotide) şi respectiv *5 S* (120 nucleotide). Cele două tipuri de molecule de ARN provin prin clivarea unui precursor comun, de 30 S. Structura terțiară (pliată) a ARNr este stabilizată prin 3 tipuri de interacțiuni: ionii de Mg ce formează punți între două sau mai multe grupări fosfat; interacțiunile ARN-ARN; interacțiunile ARN-proteine.

ARNr este transcris din 7 operoni (rrn), fiecare cu doi promotori în tandem (P_1 şi P_2), din care sunt transcrise copiile 16 S, 23 S şi 5 S.

Sinteza ARNr este controlată de concentrația aminoacizilor în celulă: rata sintezei ARNr este dependentă de rata de aprovizionare cu aminoacizi, corelată direct cu capacitatea ribosomilor de a consuma aminoacizii în sinteza proteinelor. Dacă un singur aminoacid lipseşte, sinteza proteinelor ribosomale este stopată şi celula nu mai asamblează ribosomi.

Cele 55 de tipuri de *proteine ribosomale* intră în structura ribosomului într-un singur exemplar (o singură moleculă din fiecare tip). Unele au rol *structural*, fiind esențiale pentru asamblarea ribosomului, altele au rol *funcțional*, permițând legarea ARNm în procesul traducerii şi sintezei lanțului proteic. La *E. coli*, în fiecare subunitate ribosomală, raportul ARN-proteine este 2/l, iar la alte bacterii, raportul este 2/3.

Moleculele componente au o *distribuție fixă*, riguroasă în structura ribosomului. ARNr este pliat într-o structură tridimensională ce formează regiunea centrală a ribosomului şi determină aspectul său. Proteinele sunt localizate în general la suprafața ribosomului, în depresiunile pe care le creează ARN pliat. Unele proteine conțin *domenii globulare*, localizate la suprafață, ce trimit extensii în regiunea centrală a ribosomului. Interacțiunile fixe ale componentelor condiționează procesele de autoasamblare a ribosomilor.

Ribosomii reprezintă componenta esențială a sistemului de traducere a informației genetice. Ei sunt adevăratele "fabrici" de proteine ale celulei, având rolul de a menține atât molecula de ARNm, cât şi complexul aminoacil-ARNt, într-o orientare corespunzătoare pentru a permite atât citirea mesajului, cât şi formarea legăturilor peptidice.

Ribosomii se asociază în polisomi (poliribosomi), adică grupări funcționale formate din 4–50 unități ribosomale. Dimensiunile polisomilor variază în funcție de lungimea ARNm. Polisomii sintetizează concomitent mai multe molecule proteice pe aceeaşi moleculă de ARNm.

2.6.1. Particularitățile sintezei proteinelor la bacterii

În celula eucariotă, transcrierea şi traducerea informației genetice sunt evenimente separate în timp şi spațiu, datorită compartimentării spațiului celular.

În celula procariotă, ribosomii au relații spațiale strânse cu ADN, deoarece transcrierea şi traducerea informației sunt două procese intim coordonate, care se desfăşoară aproape concomitent.

Transcrierea moleculei de ARNm durează circa 1 minut. Rata traducerii este controlată de rata transcrierii. Cele două procese sunt intim corelate şi se petrec cvasisimultan.

Traducerea este procesul ce constă în conversia mesajului secvenței bazelor ARNm în secvența aminoacizilor catenei polipeptidice. Structura ribosomului, capacitatea sa de a determina poziția ARNt pe ARNm, precum şi cataliza legăturii peptidice sunt determinate de ARNr şi nu de proteine.

Traducerea cuprinde 4 faze: inițierea, alungirea, terminarea şi reciclarea ribosomilor.

La bacterii, traducerea începe foarte repede, deoarece ARNm are o durată funcțională scurtă (1–2 minute), fiind degradat de nucleaze (la eucariote ARNm are stabilitate de ordinul orelor). Pentru a compensa instabilitatea ARNm, traducerea se inițiază timpuriu: complexul de inițiere se ataşează la capătul 5' al mesajului, înainte de transcrierea capătului 3'. Ulterior se ataşează succesiv alți ribosomi, rezultând structuri polisomice. Fiecare ribosom este legat de o moleculă proteică nascentă, a cărei lungime este direct proporțională cu lungimea mesajului pe care ribosomul l-a citit. După ce a citit integral informația ARNm, ribosomul se desprinde din polisom, eliberând polipeptidul sintetizat (Laursen şi colab., 2005) (fig. 17).

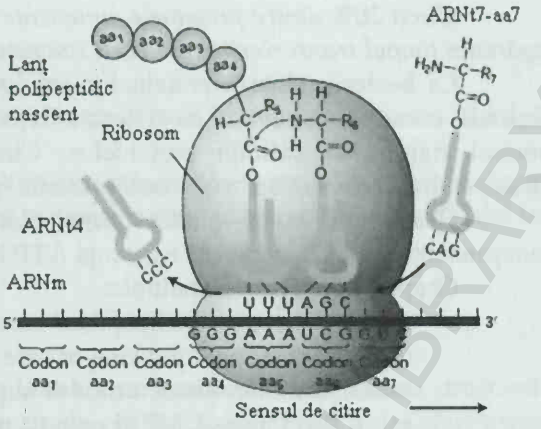


Fig. 17. Funcțiile ribosomului în biosinteza proteinelor. ARNm este tradus prin acțiunea cooperantă a ARNt și a ribosomului. Prin secvența anticodon, ARNt se leagă la codonii complementari a ARNm. Formarea unei legături peptidice între gruparea NH_2 a ARNt-aa nou venit și gruparea COOH terminală a catenei polipeptidice în creștere este catalizată de una dintre moleculele de ARNr (R = grupare laterală; aa = aminoacid, după Lodish, 5th Edition).

Cuplarea transcrierii cu traducerea are două consecințe: a) accelerează rata sintezei proteice, în sensul că traducerea nu trebuie să aștepte eliberarea ARNm de pe matrița de ADN; b) buclele de ADN sunt conectate la membrana citoplasmatică.

Pe medii nutritive bogate, cele mai multe celule bacteriene sintetizează și secretă *exoproteine,* în special în faza staționară a culturii. Proteinele pentru "export" se sintetizează pe ribosomii atasați membranei plasmatice.

2.6.2. Secreția proteinelor extracelulare la bacterii

Multe proteine rămân solubile în citoplasmă, iar altele sunt secretate prin membrana citoplasmatică.

Termenul de "secreție" semnifică trecerea unei molecule de la locul sintezei sale (citoplasma), prin membrană, la exteriorul celulei Gram pozitive sau în spațiul periplasmic al celulei Gram negative, iar cel de "translocație" semnifică transferul extracitoplasmatic al unei molecule care rămâne legată de membrană.

Toate celulele, eucariote și procariote secretă (exportă) proteine în spațiul extracelular.

La bacterii, proteinele pentru *export* se sintetizează pe ribosomii asociați membranei plasmatice. Sinteza începe cu o *secvență semnal*, de 18–35 aminoacizi, la capătul N-terminal. Prin secvența peptidică semnal, proteinele pentru export se deosebesc de cele citoplasmatice și se orientează spre calea de export. Orientarea este rezultatul legării peptidului semnal, de membrană, fie direct, fie prin intermediul unei proteine citoplasmatice denumită *chaperone**.

* Chaperonii (*chaperon*, lb. engleză = a însoți, a supraveghea) s-au definit ca o familie de proteine celulare care *mediază plierea corectă* a altor polipeptide și uneori asamblarea lor în structuri oligomere, dar care nu sunt componente ale structurilor funcționale finale (Craig și colab., 1993). Multe proteine se *pliază spontan*, dar plierea inițială a unui număr mare de proteine celulare necesită asistența chaperonilor. Proteinele care s-au pliat greșit sunt degradate proteolitic.

Unele proteine destinate exportului *nu apar niciodată în citoplasmă*, ceea ce sugerează că secreția lor se face pe măsură ce sunt sintetizate. Acestea sunt molecule relativ mici (20–40 kDa) și sunt *flexibile* pentru că nu au legături S-S și, de cele mai multe ori, nici componentă glucidică. Pentru aceaste proteine, *translocația este cotranslațională.* Secvența semnal hidrofobă N-terminală se angajează în traversarea membranei, înainte ca restul moleculei să fie sintetizată. După ce secvența semnal ajunge pe suprafața externă a membranei plasmatice, este clivată și digerată, iar proteinele exportate rămân asociate membranei, până ce plierea este completă.

Alte molecule se sintetizează complet înainte de începerea exportului. După terminarea sintezei, moleculele destinate exportului *nu dobândesc configurația terțiară* în citoplasmă, deoarece factori proteici din categoria chaperonilor, interacționează cu polipeptidele nascente și blochează plierea lor, astfel încât proteinele sunt menținute într-o configurație parțial nepliată, compatibilă cu transferul.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Circa 20% dintre proteinele sintetizate nu ajung la destinația finală, datorită erorilor care au apărut în timpul transcrierii, traducerii sau pentru că nu s-au pliat corect.

La bacterii, sinteza proteinelor are loc cu o rată foarte înaltă: 15–20 aminoacizi/ribosom/ secundă, ceea ce echivalează cu sinteza a 30.000 polipeptide/min. Rata înaltă a traducerii necesită un control riguros al calității proteinelor. Circa 30% din totalul proteinelor, necesită asistența chaperonilor. Decizia destinației unei proteine (pliere-degradare) trebuie luată rapid.

Chaperonii asistă plierea proteinelor în periplasmă, într-o manieră cel mai probabil independentă de ATP, deoarece existența ATP în periplasmă este foarte improbabilă.

Chaperonii au funcții multiple:

- interacționează cu polipeptidul nascent şi previn adoptarea conformației incorecte, până la terminarea sintezei proteinelor care rămân în citoplasmă;
- asistă asamblarea structurilor de suprafață ale celulei: flageli, fimbrii, pili;
- asistă asamblarea OMP şi secreția proteinelor în mediu;
- au rol important în replierea proteinelor denaturate, constituind un mecanism important de protecție față de agentul termic sau alte condiții de stress. Unele molecule chaperone sunt sintetizate specific în condițiile care duc la acumularea proteinelor denaturate şi se numesc *proteine de şoc termic.*

Molecula precursoare este orientată spre situsul său membranar specific, prin intermediul peptidului semnal, al chaperonului sau al ambelor tipuri de molecule.

Proteinele structurilor de înveliş sunt sintetizate de asemenea, pe polisomii ataşați membranei citoplasmatice. Pe măsură ce sunt sintetizate, catenele peptidice nascente sunt transferate în grosimea membranei. Unele se termină în membrana internă, iar altele în spațiul periplasmic sau în membrana externă.

Chiar şi fosfolipidele apar inițial în membrana internă şi ulterior difuzează spre membrana externă.

La bacteriile Gram negative, translocația este un proces complex, deoarece moleculele trec în spațiul periplasmic, printr-un proces dependent de energie (Pugsley, 1993). O proteină de translocație (Sec A) localizată în membrana internă, leagă şi hidrolizează ATP. Energia eliberată este utilizată pentru inițierea translocației prin membrana citoplasmatică. Cele mai multe proteine secretate de bacteriile Gram negative ramân în spațiul periplasmic şi au o semnificație metabolică (sunt enzime degradative). Majoritatea sunt proteaze şi furnizează nutrienți asimilabili pentru celulă. Membrana externă a peretelui celular nu are sursa de energie necesară excreției. Din această cauză, o proteină translocată în spațiul periplasmic printr-un proces dependent de energie, nu poate fi translocată printr-un mecanism similar, prin membrana externă, ceea ce demonstrează intervenția unor proteine specifice de translocație ale membranei externe.

La bacteriile Gram pozitive, proteinele destinate membranei citoplasmatice şi peretelui celular se sintetizează fără secvențe semnal. Prin analogie cu exportul proteinelor la *E. coli*, proteinele membranei citoplasmatice sunt integrate spontan, prin interacțiuni ionice şi hidrofobe.

Proteinele secretate sunt în special enzime degradative: proteaze, amilaze, RN-aza, levan-sucraza.

Proteinele de export se sintetizează cu o secvență semnal, de 18–35 aminoacizi, cu capătul amino încărcat pozitiv, urmat de o secvență hidrofobă, pe ribosomii asociați membranei citoplasmatice. Mecanismul de export al exoproteinelor, la *B. subtilis* este probabil, asemănător cu cel de la *E. coli*.

La *B. subtilis*, proteinele translocate prin membrană sunt supuse clivajului secvenței semnal şi rămân legate de peretele celular sau sunt eliberate în mediul extern (Simonen şi Palva, 1993).

Mecanismul de export al exoproteinelor este complicat de faptul că, unele specii de *Bacillus* (dar nu *B. subtilis)* şi la numeroase tulpini Gram negative, la exteriorul peptidoglicanului se găseşte un strat proteic (stratul S) prevăzut cu pori, care permit trecerea proteinelor.

Unele proteine se sintetizează cu o secvență suplimentară de aminoacizi, localizată între peptidul semnal şi proteina propriu-zisă, denumită *propeptid.* Unele propeptide sunt lungi, altele scurte. Cele lungi sunt caracteristice proteazelor. Exoproteazele la *B. subtilis* sunt sintetizate ca *preproenzime*, adică au atât secvența semnal, cât şi propeptidul. Propeptidul pare a avea mai multe funcții:

– în excreția moleculei de exoprotează;
– împiedică activarea enzimei în timpul secreției;
– leagă proteaza de membrana citoplasmatică.

Datorită secvenței propeptidului, la procariote, proteazele, sunt secretate sub forma inactivă, ca *zimogen*, la fel ca şi la eucariote,

Propeptidele scurte sunt formate din câteva resturi de aminoacizi. Funcția lor nu se cunoaşte. După translocație, exoproteinele sunt eliberate în mediu cu propeptidele scurte atașate, dar clivajul lor survine imediat.

2.7. Sporul

Sporul este o forma primitivă de diferențiere celulară, care constă în reorganizarea structurală şi funcțională a celulei vegetative şi formarea unui nou tip de celulă, cu proprietăți noi. Diferențierea celulară este un proces biologic fundamental.

Sporii se formează la bacteriile cilindrice: totdeauna la bacilii anaerobi din genul *Clostridium* şi la actinobacterii, facultativ la cei aerobi din genul *Bacillus* (fig. 18), excepțional la coci (*Sporosarcina).* Toate bacteriile sporulate sunt Gram pozitive. Sporularea este condiționată de existența unui perete mureinic gros.

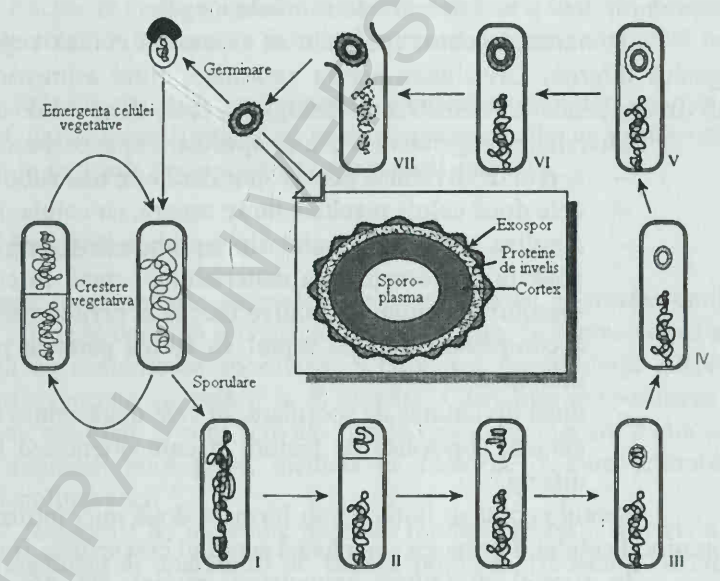


Fig. 18. Reprezentarea schematică a etapelor de formare a endosporului.

Există circa l0 tipuri de spori, ce se deosebesc prin modul de formare, prin structură şi prin gradul de rezistență la factorii de mediu. Cel mai caracteristic este *endosporul*, denumit astfel deoarece se formează în interiorul unei celule vegetative.

La actinobacterii se formează câteva tipuri de spori: *artrospori* (prin segmentare), *oidiospori* (prin fragmentare), *aleuriospori* (se formează apical sau lateral pe sporofori scurți), *zoospori* (spori mobili), iar *aplanosporii* se formează prin septarea hifelor şi sunt menținuți în interiorul unui înveliş. La *Azotobacter* se formează *chişti.*

Endosporul sau sporul endogen a fost considerat ca unic tip sporal bacterian, până la descrierea celorlalte tipuri. Are formă sferică sau ovalară. Cei ovalari au dimensiuni cuprinse între 0,5–1 μm, pentru axul scurt şi 1,2–2 μm pentru axul lung.

Evidențiere. Endosporul este o structură refringentă şi în celula vie, la microscopul optic apare strălucitor. Datorită învelişurilor groase, greu penetrabile pentru coloranți (în special cortexul) şi datorită conținutului lor chimic particular, sporul se colorează prin tehnici speciale.

Poziția sporului în celulă poate fi terminală, subterminală sau centrală. Sporii pot fi *deformanți* (diametrul lor este mai mare decât al celulei) şi *nedeformanți* (diametrul este mai mic decât al celulei).

Într-o celulă bacteriană sporulantă, sporul este unic, cu rare excepții: în sol apar bacterii *bisporulate*, iar în intestinul unor vertebrate aquatice, s-au evidențiat bacterii *polisporulate.* Probabil că

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

sporii multipli apar ca rezultat al perturbării mecanismului de separare a celulelor după diviziune. Ei se formează în celulele în care materialul nuclear s-a replicat, dar nu s-a format septul de diviziune.

Sporogeneza este declanşată în mod obişnuit de lipsa unui nutrient esenţial în mediu (sursa de azot sau de carbon). Procesul este foarte complex din punct de vedere genetic, biochimic, structural şi funcţional.

Sporularea implică activarea unui număr de peste *50 de gene* sporale, inactive în celula vegetativă (Errington, 1993). Sub aspect *biochimic*, sporularea este însoţită de modificări majore ale componentelor moleculare. Se sintetizează un set de *proteaze* care măresc turnover-ul proteic, furnizând aminoacizii necesari sintezei proteinelor noi.

Din punct de vedere *structural*, la nivel electrono-optic, sporularea la *B. subtilis* parcurge 7 stadii (numerotare introdusă de Ryter, cu cifre romane – I–VII), în cursul cărora celula sporală se formează şi se eliberează (fig. 20).

Celula vegetativă în care nu se detectează modificări structurale legate de sporulare a fost desemnată cu *stadiul 0*. Sporularea este precedată de *replicarea* materialului nuclear. Cei doi cromosomi fuzionează, formând o *structură axială* alungită, unică (stadiul I). Nucleoidul axial diploid *segregă* în două structuri cromosomale: una migrează spre polul sporal şi va deveni *nucleoidul sporului*, iar cealaltă rămâne în celula vegetativă. Celula se divide asimetric, subpolar prin formarea *septului sporal* şi se formează două celule inegale.

Diviziunea pentru sporulare se aseamănă cu cea vegetativă, dar se deosebeşte prin expresia genică diferită. Diviziunea pentru sporulare, fiind asimetrică, necesită relocalizarea aparatului de diviziune celulară. Asimetria morfologică a celor două celule duce la evoluţii ulterioare diferite.

Diviziunea vegetativă şi cea de sporulare se deosebesc prin mai multe caracteristici:

- septul de diviziune pentru sporulare este mai subţire decât septul diviziunii vegetative;
- cele două celule rezultate nu se separă, iar celula mamă înglobează presporul;
- autoliza peptidoglicanului din septul de diviziune începe la centrul septului şi progresează până la liza completă a materialului septal. În contrast, autoliza materialului parietal al septului diviziunii vegetative începe la periferia septului şi progresează spre centru, dar nu e completă, deoarece septul va forma peretele polar al celor două celule rezultate din diviziune;
- după diviziunea de sporulare, în cele două celule se iniţiază programe diferite de expresie genică, controlate de factorii σ care orientează legarea ARN-polimerazei de promotori diferiţi.

Septul sporal se iniţiază sub forma a două mici intruzii simetrice ale peretelui mureinic, spre interiorul celulei. Formarea completă a septului corespunde *stadiului II*.

În timpul diviziunii asimetrice, numai 1/3 din cromosom este prezent în structura presporală. Restul de 2/3 este pompat rapid de o *translocază*, rezultând două celule inegale, dar cu genomuri identice. După diviziunea asimetrică, presporul şi celula vegetativă sunt celule adiacente, complet separate.

În *stadiul al III-lea*, septul polar se subţiază şi se lizează din zona centrală spre periferie. Membrana citoplasmatică, după ce îşi pierde punctele de legătură cu septul, începe să se plieze şi acoperă progresiv suprafaţa sporului. Când plierea este completă, cele două pliuri membranare fuzionează la polul celulei şi celula sporală este complet înglobată în celula vegetativă.

În spaţiul dintre cele două membrane care înconjură *presporul* se depun cele două straturi de peptidoglican: *peretele celular primordial şi cortexul* (*stadiul IV*).

Stadiul V corespunde depunerii unei structuri proteice complexe pe suprafaţa externă a presporului, formată din două lame: *învelişul sporal intern* (intina) şi *învelişul sporal extern* (exina). *Stadiul VI* corespunde maturării sporului şi *dobândirii rezistenţei la căldură şi la radiaţiile UV*, iar *stadiul VII* corespunde *lizei celulei* şi eliberării sporului matur.

Schimbările morfologice profunde care se produc în timpul sporulării sunt cuplate cu modificarea expresiei genelor, datorită activării în cascadă a *factorilor σ*, care modifică specificitatea de legare a ARN-polimerazei, de promotorii diferitelor gene.

S-au izolat mutante bacteriene care blochează sporogeneza în diferite etape.

2.7.1. Structura internă a endosporului

La diferite grupe de bacterii există variaţii importante ale structurii sporului, în special în privinţa învelişurilor, care diferă prin numărul şi grosimea lor. Există de asemenea variaţii cu privire la relaţia sporului cu celula vegetativă în care s-a format: sporul rămâne inclus în celulă sau se eliberează curând după formare, prin liza acesteia.

Sporul este alcătuit din *protoplastul sporal*, care conţine *sporoplasma* şi *materialul nuclear*. Protoplastul sporal este acoperit de următoarele structuri:

- *un perete intern* subţire, originar din membrana internă a presporului. După germinare, acesta va forma peretele celulei vegetative;
- *cortexul sporal,* cu grosime variabilă, electronoclar. Este o structură multilaminară ce se formează pe feţele adiacente ale celor două membrane ale presporului şi constă, în general, din peptidoglican şi un lactam muramic specific sporului;
- *stratul extern* al cortexului, derivat din membrana externă a presporului;
- *învelişul sporal intern (intina),* un strat dens, de natură proteică;
- *învelişul sporal extern (exina).* Uneori, aceste două învelişuri sunt pluristratificate;
- *exosporul,* este constituit dintr-un rest al celulei vegetative, adiacent celorlalte învelişuri sporale, prin intermediul filamentelor "suspensoare".

Învelişurile sporale cuprind o fracţie majoră a sporului. Aceste structuri sunt de natură proteică, cu o fracţie de polipeptide acide solubile în baze, în învelişul intern şi o fracţie rezistentă la baze, datorată legăturilor S-S.

La unele categorii de spori se găsesc structuri suplimentare denumite *apendice sporale.* Semnificaţia lor funcţională nu este certă, dar ar putea fi implicate în dispersarea sporilor în natură sau ar facilita absorbţia substanţelor nutritive în perioada premergătoare germinării sporului.

2.7.2. Particularităţile biochimice ale sporului

Sporularea este iniţiată ca răspuns la numeroase semnale externe şi interne: epuizarea unui nutrient, densitatea celulară. Sporularea eficientă necesită o densitate celulară mare. Scăderea amplă a concentraţiei GTP şi GDP se corelează cu declanşarea sporulării. Schimbarea specificităţii ARN-polimerazei este foarte importantă pentru controlul sporulării la *B. subtilis*. Când începe sporularea, multe gene active în celula vegetativă sunt represate şi sunt activate genele specifice. Fiecare stadiu al sporulării este marcat de schimbarea expresiei unor gene, mediată de *factorul* σ, care schimbă specificitatea legării de promotor a ARN-polimerazei.

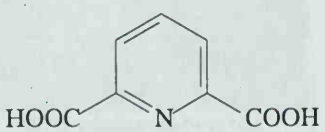
Protoplastul sporal conţine toate categoriile de molecule necesare reluării creşterii: materialul nuclear şi cantităţi mici ale fiecărui component al aparatului de sinteză proteică (ribosomi, ARNt, enzime). Lipsesc componentele celulare instabile (ARNm şi nucleozid-trifosfaţii), dar sunt prezenţi precursorii lor mai stabili (nucleozid mono- şi difosfaţi). Aminoacizii şi enzimele lor de biosinteză sunt virtual absente, dar la germinare, ambele tipuri vor fi generate prin hidroliza proteinelor de depozit, solubile, cu moleculă mică.

Puţine enzime sporale derivă din enzimele celulei vegetative prin clivare. Majoritatea enzimelor sporale *sunt noi*. Sinteza lor este codificată de gene activate în timpul sporulării.

Toate enzimele sporale sunt *termorezistente*, fapt explicabil prin dimensiunile lor mici, fiind reprezentate numai de situsul activ al moleculei. Lipsesc enzimele fundamentale ale metabolismului celular, ca si sistemele transportoare de electroni.

La cele mai multe bacterii, ionii de Ca lipsesc. În stadiile timpurii ale sporulării se activează sistemele de transport activ pentru Ca. Ionii de Ca sunt legaţi cu o cantitate echivalentă de *acid dipicolinic* (se formează din acidul diaminopimelic – un precursor al peptidoglicanului) şi formează *dipicolinatul*, care poate constitui circa 15% din greutatea uscată a sporului.

S-a considerat că sporul este rezultatul unui proces de deshidratare profundă. Cercetările ulterioare au evidenţiat că deosebirile dintre spor şi celula vegetativă nu sunt de ordin cantitativ, ci de ordin calitativ şi se referă la *starea apei*. În celula vegetativă, apa liberă reprezintă 70% din cantitatea totală, iar în spor oscilează între 3–10%,



Acidul dipicolinic

restul de 90–97% fiind *apa legată*. Din această cauză, sporul este lipsit de metabolism, sau are un metabolism de intensitate foarte mică, nedecelabilă. Celula sporală este vie, dar procesele vieții sunt *latente*. Fenomenul se numește *criptobioză* (viață ascunsă).

Consecința particularităților de compoziție chimică, la care se adaugă învelișurile groase multiple și pluristratificate, este rezistența deosebită a sporului la *căldură,* la acțiunea *substanțelor chimice* (antiseptice, dezinfectanți) și a *radiațiilor*. Rezistența termică este conferită de *dipicolinatul de Ca*. Mutațiile care reduc cantitatea de dipicolinat diminuă rezistența sporului la agentul termic.

Rezistența termică a sporului impune o metodologie costisitoare de sterilizare, la temperaturi foarte ridicate. Uneori, sporii rezistă la temperatura de 180°C, de la câteva minute, la câteva ore. Fierberea nu este o metodă de sterilizare, deoarece omoară numai formele vegetative, iar sporii rămân viabili.

Germinarea este procesul ireversibil în care sporul se activează de la starea latentă, la o stare metabolic activă, într-un interval scurt. *L-alanina* se leagă la un receptor specific pe suprafața învelișului sporal și inițiază germinarea, care decurge în trei stadii:

- *activarea* sporului prin deshidratare, asociată cu mărirea volumului;
- *germinarea*, adică modificarea localizată prin gelificare a învelișurilor sporale;
- *emergența* celulei vegetative din învelișuri, delimitată de un perete derivat din peretele sporal intern.

Într-un mediu nutritiv optim, germinarea este rapidă: de la inițiere până la diviziunea celulară, procesul durează 90 de minute. În medii favorabile, majoritatea sporilor germinează, dar o proporție mică rămân în stare latentă.

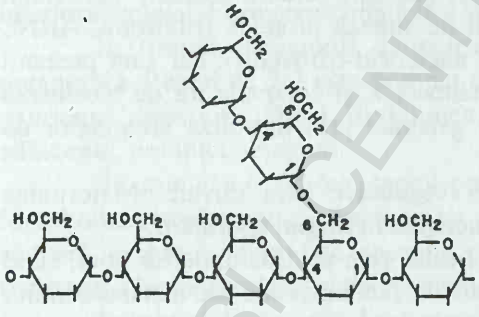
Pentru inițierea germinării, sporii necesită ca factori suplimentari: un compus cu grupări – SH și pH acid. După circa o oră de la începutul activării începe sinteza ADN.

2.8. Incluziile

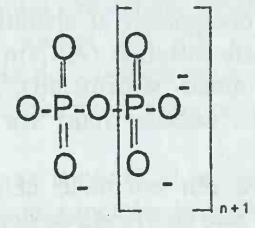
Incluziile sunt structuri inerte, ce apar în celula bacteriană la sfârșitul fazei de creștere logaritmică.

După compoziția chimică, incluziile sunt de 3 tipuri:

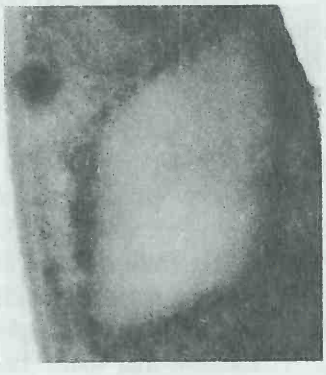
- *polimeri organici*: *polizaharidici* (amidon, glicogen), incluzii de *poli β-hidroxibutirat* (PHB) ce conțin lipide (2%) și proteine, *polimeri de natură proteică* (incluzia parasporală la *B. thuringiensis*) (fig. 19);
- *polimeri anorganici* (polimetafosfat, denumite incluzii de volutină);
- incluzii *anorganice simple* (de sulf coloidal, $CaCO_3$).



a



b Polifosfat

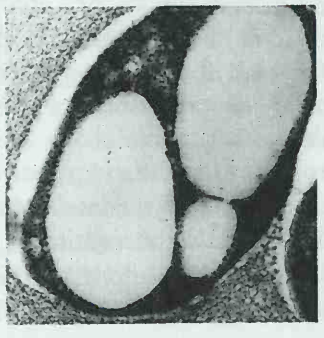


e

$(CH_3CHOHCH_2COOH)_n$

Acid poli-β-hidroxibutiric (PHB)

c



d

Fig. 19. Incluzii bacteriene. a. Formula structurală a glicogenului (molecule de glucoză legate ά -1,4, cu ramificații ά -1,6. b. Polifosfatul. c. Acidul poli-β-hidroxibutiric. d. Imaginea electrono-optică a celulei de *Azotobacter* cu incluzii de poli-β-hidroxibutirat. e. Imaginea electrono-optică a incluziei proteice parasporale la *B. thuringiensis* (original).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITARĂ

După criterii structurale se disting:

- incluzii *delimitate de membrane*, ce au ca prototip pe cele de poli-β-hidroxibutirat. Ca trăsătură distinctivă, ele relevă o structură lamelară concentrică, ce corespunde creşterii progresive a incluziei. Sinteza se face pe o cale laterală a sintezei acizilor graşi;
- incluzii lipsite de membrane (cele de glicogen, de sulf, incluzia proteică parasporală).

La microscopul optic, în celula vie, incluziile au aspect granular cu formă neregulată, refringente, cu dimensiuni de 50–100 nm.

Natura chimică a incluziilor se evidenţiază prin metode citochimice, cu coloranţi specifici. Incluziile de *amidon* (poliglucozid neramificat) se colorează în *albastru* cu soluţia Lugol, iar *glicogenul* (poliglucozid ramificat) se colorează în *brun*. Incluziile de PHB se colorează cu *negru de Sudan*, ca şi depozitele lipidice neutre ale celulei eucariote şi din această cauză au fost identificate incorect ca rezerve lipidice. Incluziile *proteice* se colorează cu *amido-schwarz*, iar cele de *polimetafosfat* sunt *metacromatice*, pentru că după colorare cu albastru de metilen, dobândesc culoarea roşie.

Ca regulă generală, o specie bacteriană formează un singur tip de depozit celular.

Granulele de *volutină* (polimetafosfat), denumite astfel pentru că s-au identificat la *Spirillum volutans*, sunt polimeri lineari de ortofosfaţi, de lungime variabilă. Se sintetizează în condiţiile deficitului oricărui nutrient major, prin adăugarea secvenţială a resturilor de fosfat la pirofasfat, după reacţia:

$$-P-P- + ATP \longrightarrow -P-P-P- + ADP$$

$$(-P-)n + ATP \longrightarrow (-P-)n+1 + ADP$$

Degradarea polifosfatului urmează reacţia inversă şi furnizează energie celulară sub formă de ATP.

Incluziile de *sulf anorganic* pot fi citoplasmatice sau sunt localizate la nivelul unor pliuri ale membranei plasmatice şi apar la două grupe fiziologice de bacterii:

- la cele sulfuroase purpurii (*Chromatiaceae*), care folosesc H_2S ca donor de electroni în procesul fotosintezei;
- la cele filamentoase *chimiolitotrofe* (*Beggiatoa, Thiotrix*), care oxidează H_2S şi eliberează energie. După epuizarea H_2S din mediu, sulful depozitat în celulă este oxidat la sulfat.

Semnificaţie biologică. Formarea incluziilor constituie o modalitate a celulei de a depozita cantităţi mari de materiale de rezervă. Ele se formează în condiţiile unui mediu bogat în substanţe nutritive, sau în cazul unui dezechilibru al compoziţiei chimice a mediului, în special al raportului C/N. Conţinutul incluziei este metabolizat după epuizarea resurselor energetice din mediu sau când raportul C/N revine la normal.

Stocarea moleculelor sub forma polimerilor este o modalitate de păstrare a echilibrului osmotic între celulă şi mediu, deoarece prin polimerizare moleculele devin inactive osmotic. Prin polimerizarea acidului PHB se evită acidifierea citoplasmei, consecutivă acumulării monomerilor. Grupările libere –COOH ale acidului PHB sunt anihilate prin formarea legăturilor esterice între monomeri.

Sinteza incluziilor proteice parasporale este sincronizată strâns cu iniţierea procesului de sporogeneză.

2.9. Glicocalixul

Glicocalixul este reprezentat de totalitatea structurilor polizaharidice extraparietale: *capsula*, cu diferite grade de dezvoltare şi *glicocalixul comportamental*.

2.9.1. Capsula

Capsula (fig. 20) este o structură accesorie, cu o consistenţă gelatinoasă, vâscoasă, care acoperă complet celula bacteriană. În funcţie de gradul de dezvoltare se disting următoarele structuri capsulare:

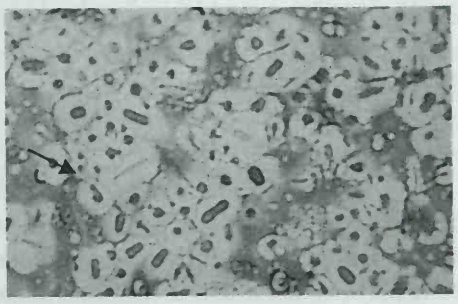


Fig. 20. Capsula bacteriană (colorație negativă, original).

- *microcapsula*, reprezentată de o peliculă fină de material polizaharidic, în jurul peretelui celular (până la 0,2 μm grosime). La microscopul optic se evidențiază numai prin metoda imunofluorescenței, dar este vizibilă la microscopul electronic;
- *macrocapsula,* o structură omogenă, aderentă de celulă, mai groasă de 0,2 μm, vizibilă la microscopul optic prin tehnici speciale de colorare negativă. Dacă are o structură laxă și flexibilă, coloranții o penetrează. Aderența macrocapsulei de celulă este fermă și prin centrifugare se depune concomitent cu celulele;
- *stratul mucos* este o structură capsulară cu o grosime neuniformă și distribuție dezordonată în jurul celulei. Consistența este mai fluidă, iar prin centrifugare, celulele se desprind și se depun, iar materialul polizaharidic ramâne în suspensie;
- *zoogleea* – o masă de material polizaharidic, în care sunt cuprinse un număr mare de celule bacteriene.

Materialul capsular se găsește la bacteriile Gram pozitive și Gram negative din sol, ape (dulci și sărate), rumen, la bacteriile patogene ce produc infecții urinare și pulmonare.

2.9.1.1. Natura chimică a materialului capsular

Materialul capsular este de natură *polizaharidică.* De cele mai multe ori, în alcătuirea sa se găsesc D-glucoza, D-fructoza, D-galactoza. Mai rare sunt manoza, fucoza, pentozele. Unele polizaharide extracelulare se aseamănă cu acizii teichoici deoarece conțin glicerol-fosfat sau ribitol-fosfat.

Materialul capsular poate fi un *homopolizaharid* sau un *heteropolizaharid.* Cele mai cunoscute *homopolizaharide* sunt *dextranii* și *levanii.*

Dextranii formează o clasă mare de polizaharide, alcătuiți din unități de D-glucopiranozil, legate α 1–6, cu punți de ramificare în pozițiile 2, 3 sau 4. Lungimea lanțului este cuprinsă între 40–500 resturi de glucoză. Dextranii sunt produși de *Peptococcus (Leuconostoc) mesenteroides,* din sucroză. Sinteza lor este abundentă în melasa de la fabricile de zahăr, unde o cantitate semnificativă de zahăr este convertită la dextran, aducând prejudicii economice importante.

În stare purificată, *dextranul* se folosește în practica transfuziilor, ca înlocuitor al plasmei, fiind solubil în apă, iar *sephadexul* este un dextran folosit în cromatografia bazată pe principiul sitei moleculare.

Levanii sunt poli-D-fructani (fructozizi), sintetizați de unele bacterii patogene pentru plante (*Pseudomonas sp., Xanthomonas sp.),* de *Streptococcus salivarius*, de *Bacillus sp.* Au greutăți moleculare de 1000 kDa sau mai mult.

Heteropolizaharidele sunt alcătuite dintr-un număr variat de unități repetitive alcătuite din monomeri diferiți: glucoză, fructoză, galactoză, manoză, acid galacturonic, derivați aminați și acetilați ai acestora.

Structura biochimică a heteropolizaharidelor este foarte diferită nu numai în funcție de compoziția chimică globală, ci și de secvența diferiților monomeri în catena polizaharidică (de exemplu, pentru xantan, structura repetitivă este un pentazaharid).

Diversitatea monomerilor glucidici conferă heteropolizaharidelor o anumită diversitate a structurii chimice și în consecință, o anumită specificitate antigenică. De exemplu, la *Str. pneumoniae* există peste 80 de tipuri chimice diferite de material capsular, care corespund nu numai unor diferențe de compoziție chimică, dar și de secvență a monomerilor. Varianta antigenică a polizaharidului capsular imprimă specificitatea anticorpilor în reacțiile de apărare față de diferitele tulpini patogene ale acestei bacterii.

La bacteriile care au informația codificatoare, sinteza materialului capsular este modulată cantitativ de compoziția mediului de creștere. De exemplu, *Peptococcus mesenteroides* sintetizează dextrani numai dacă crește pe mediul cu sucroză. Celulele de *Azotobacter*, cultivate pe un mediu cu N combinat nu sintetizează material polizaharidic, dar pe un mediu fără N combinat, produc un strat mucos abundent, cu caracter adaptativ care limitează difuzia O_2 în celule, protejând astfel *nitrogenaza*, sensibilă la prezența O_2.

Bacteriile enterice sintetizează polizaharide în condițiile unui exces de glucide şi ale limitării surselor de N, P, S, în mediul nutritiv.

Pe măsură ce cultura bacteriană care sintetizează polizaharide se dezvoltă, mediul lichid devine tot mai vâscos, datorită solubilității polimerilor în apă.

Unele bacterii sintetizează continuu exopolizaharide, în timpul fazei de creştere, iar altele, numai în faza logaritmică târzie şi în faza staționară.

Capsula este o structură inertă, accesorie ce nu face parte integrantă din celula bacteriană. Cel mai adesea nu îndeplineşte o funcție esențială pentru celulă.

Bacteriile patogene capsulate sunt virulente, deoarece capsula este un material *chimiotactic negativ* pentru fagocite. Pe mediul solidificat, ele produc colonii *netede* (S, *s*mooth). Mutantele lor necapsulate produc colonii *rugoase* (R, *r*ough) şi sunt mult mai puțin virulente.

Materialul capsular este higroscopic (reține apa) şi astfel protejează celula de desicație. Materialul capsular ar putea avea rolul de depozit al unor nutrienți din mediu.

Biosinteza celulozei. Unele bacterii sintetizează celuloza ca un produs exclusiv extracelular, care îndeplineşte funcții fiziologice importante în mediile naturale: protecție mecanică, chimică şi fiziologică la *Acetobacter xylinum* şi *Sarcina ventriculi*; uşurează aderența în timpul interacțiunii simbiotice *Rhizobium*-plante leguminoase sau a interacțiunii infecțioase pentru speciile de *Agrobacterium.* Ipoteza actuală a biogenezei celulozei la plante şi la bacterii consideră că, complexul membranar al celulozo-sintazei polimerizează resturile de glucoză (UDP-Glc) în lanțuri de glucani legați beta-1,4 şi rezultă fibrile cristaline rigide, care sunt extruzate la suprafața celulei (Ross şi colab., 1991). La *A. xylinum*, sintaza celulozei este alcătuită din cel puțin două subunități asemănătoare, dar distincte funcțional.

2.9.2. Glicocalixul comportamental

La anumite bacterii structurile superficiale sunt acoperite de un *glicocalix* adevărat, constituit dintr-o rețea de filamente polizaharidice şi glicoproteice, legate de LPS ale membranei externe la bacteriile Gram negative (fig. 21) sau de mureina celor Gram pozitive. Filamentele formează o structură *pericelulară* dezordonată, ca o pâslă, prin intermediul căreia celula se ancorează fie pe alte celule, fie pe suporturi inerte.

Glicocalixul se găseşte numai la bacteriile care trăiesc în *mediile naturale*, având un caracter *adaptativ*, adică există numai în condițiile în care prezența ei conferă celulei un avantaj selectiv. După cultivare în medii artificiale (bulion, geloza), glicocalixul dispare şi din această cauză s-a evidențiat târziu. Deoarece nu persistă la celulele cultivate în mediile artificiale, s-a propus denumirea de *glicocalix comportamental.*

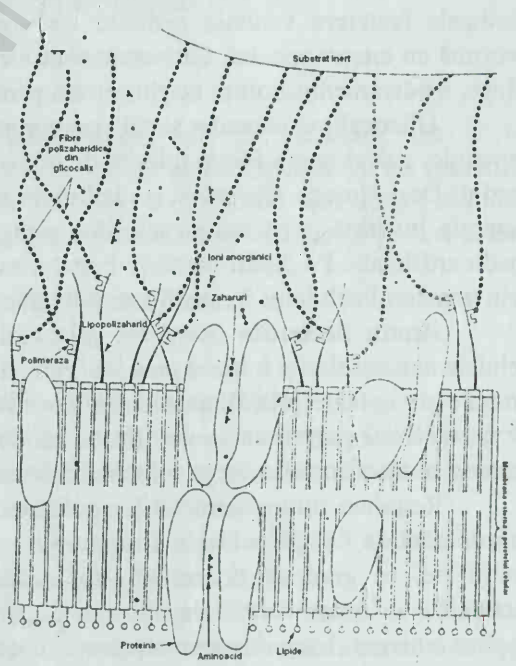


Fig. 21. Reprezentarea schematică a glicocalixului legat de membrana externă a unei bacterii Gram negative (după Costerton, 1978).

Glicocalixul a fost studiat la celulele bacteriene din *placa dentară.* Placa este un depozit de culoare alb-gălbuie, vizibil cu o lupă, ce se formează pe suprafața smalțului dentar, inițiată de *Str. mutans.* Celulele sale sintetizează un polizaharid glucanic şi acizi lipoteichoici, prin intermediul cărora aderă foarte strâns de suprafața smalțului, formând inițial o microcolonie, iar ulterior, o colonie. Celulele aderă între ele, dar şi de smalțul dentar (hidroxil-apatita), prin glicocalix. După impregnare cu săruri şi glicoproteine salivare se creează un micromediu anaerob, în care bacteriile elimină produsele de catabolism. Micromediul coloniei se acidifică şi se creează condițiile favorabile degradării smalțului. În prezența sucrozei, la pH acid, sinteza ALT este stimulată semnificativ. Astfel se inițiază formarea cariei.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În mediul aquatic, celulele bacteriene lipsite de structură capsulară se asociază, formând *biofilme**. Celulele se ancorează de suport, prin intermediul glicocalixului, formând un consorțiu funcțional. *Biofilmul se definește ca un ansamblu format din celule și din produse extracelulare prin intermediul cărora se ancorează de suportul viu sau inert, formând asociații.* În biofilm, celulele bacteriene au un fenotip modificat în ceea ce privește rata de creștere și de transcriere a genelor. Legarea (aderența) celulelor de suport este prima etapă a procesului de colonizare. Astfel se inițiază formarea coloniei bacteriene.

*Majoritatea microorganismelor din mediile aquatice nu se găsesc ca organisme libere plutitoare, ci trăiesc atașate de suprafețe, inclusiv la suprafața apei, unde formează un *biofilm*. În matricea unui biofilm, asociațiile naturale de bacterii funcționează ca un consorțiu cooperant. Biofilmele reprezintă sisteme biologice cu un nivel înalt de organizare, în care comunitățile de bacterii sunt coordonate funcțional.

În mediile naturale, glicocalixul este structura care mediază asocierile bacteriene *polispecifice*. Astfel, în rumen, se formează asociații coloniale *polispecifice* (colonii polibacteriene). Între ele se stabilesc *relații metabolice sinergice,* prin care bacteriile realizează activități metabolice, pe care speciile separate nu le pot desfășura. De exemplu, în rumen se sintetizează CH_4: unele bacterii produc H_2, altele CO_2, iar bacteriile metanogene reduc CO_2, utilizând H_2 ca sursă reducătoare.

Capacitatea lor de a popula întreaga biosferă se datorează *versatilității* lor metabolice și *plasticității fenotipice*. Teoria plasticității fenotipice consideră că bacteriile răspund modificărilor mediului de viață prin schimbări structurale și funcționale (metabolice) profunde, *în cadrul aceleiași norme genetice.*

Prin intermediul biofilmului, celulele bacteriene se atașează de suport și se agregă, amplificând interacțiunile celulare. Prin atașare, bacteriile dobândesc avantajul *versatilității fenotipice.*

Biofilmele formate *in situ* de bacteriile patogene sau potențial patogene pe dispozitivele medicale (catetere venoase centrale, catetere urinare, lentile de contact, dispozitive intrauterine) prezintă un interes special. Cateterele centrale se montează pentru administrarea fluidelor (produse din sânge, medicamente, soluții nutritive) sau pentru monitorizarea hemodinamicii.

Glicocalixul capsular și cel comportamental sunt structuri foarte variabile din punct de vedere fenotipic, având grade foarte diferite de dezvoltare la aceeași tulpină bacteriană, în diferite condiții de mediu. Deși sinteza reprezintă o cheltuială semnificativă de energie, rolul lor funcțional în mediile naturale justifică existența structurilor polizaharidice. Glicocalixul dispare la celulele cultivate în medii artificiale. Pe medii nutritive bogate, existența acestor structuri nu mai este necesară, dar reapar prin transferul celulelor în medii naturale nefavorabile.

Pentru bacteriile *patogene*, glicocalixul este structura prin care celulele se ancorează de celulele mucoaselor și inițiază *procesul infecțios*. De exemplu, *Neisseria gonorrhoeae* aderă la celulele uretrale și vaginale prin filamentele glicocalixului. Uneori, legarea mediată de glicocalix are caracter de *specificitate* pentru un anumit tip de celule ale gazdei (de exemplu, bacteriile care inițiază procese patologice intestinale se leagă cel mai adesea exclusiv de epiteliul intestinal).

Reunirea tuturor structurilor polizaharidice extraparietale, indiferent de gradul de dezvoltare sub denumirea de glicocalix a fost propusă de Costerton (1982). Capsula este cea mai importantă dintre ele, ca grad de dezvoltare, dar toate structurile polizaharidice îndeplinesc aceiași funcție esențială – *aderența celulei* de substrat. Gradul diferit de dezvoltare, de la glicocalix la macrocapsulă implică o diversificare corespunzătoare a funcțiilor acestor structuri.

Prin gradul lor foarte diferit de dezvoltare în raport cu condițiile de mediu, structurile polizaharidice extraparietale sunt expresia autentică a *plasticității fenotipice* structurale a bacteriilor.

Plasticitatea fenotipică a bacteriilor permite *adaptarea rapidă* la schimbări majore ale mediului. Bacteriile sunt primele organisme care se adaptează la condițiile noi de mediu, în timp ce organismele superioare se adaptează mult mai lent, prin *selecția mutantelor.*

Bacteriile colonizează ecosistemele noi și prin mecanismul genetic al *selecției mutantelor.* Această dublă capacitate adaptativă – prin plasticitate fenotipică și prin selecția mutantelor – explică uriașul succes al bacteriilor de a popula chiar și cele mai ostile medii.

2.10. Flagelul

Flagelul (*flagelum* = bici) este organitul extracelular al mobilității celulei procariote. Organitele omologe de mobilitate ale celulei eucariote sunt *flagelii* și *cilii*. Flagelii se mai numesc și *undulipode* (*undula* = undă mică; *pus, podos* = picior).

Flagelul bacterian se prezintă ca un filament extracelular, filiform, ondulat, cu grosimea uniformă pe toată lungimea sa. Lungimea este variabilă, de la 4–5 μm până la 70 μm, iar diametrul este de 20 nm.

Flagelii nu se observă prin examinarea directă a celulelor la microscopul optic. Existența lor se deduce indirect, din mobilitatea celulelor bacteriene pe preparatele din cultura vie. Celulele fără flageli se numesc *atrihe*. După numărul și modul de așezare a flagelilor, bacteriile sunt (fig. 22):

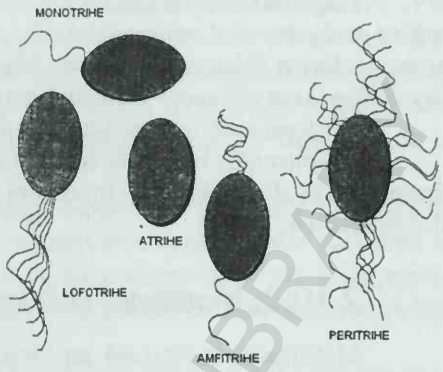


Fig. 22. Reprezentarea schematică a modului de așezare a flagelilor unei celule bacteriene. Bacteriile fără flageli se numesc atrihe.

- monotrihe (cu un singur flagel);
- amfitrihe (cu doi flageli așezați la cei doi poli ai unui bacil);
- lofotrihe (cu mai mulți flageli la unul dintre poli);
- peritrihe (cu mai mulți flageli dispuși pericelular).

Poziția flagelului (sau flagelilor) poate fi polară, subpolară sau ecuatorială.

2.10.1. Structura flagelului

Comparativ cu flagelul celulei eucariote, flagelul bacterian are o structură simplă, cu originea în structurile de înveliș ale celulei și este alcătuit din următoarele elemente (fig. 23):

- *corpusculul bazal*, localizat în învelișurile celulare;
- *cârligul*;
- *filamentul extern* (flagelul propriu-zis).

Corpusculul bazal formează o structură rotativă unică, atât ca alcătuire, cât și ca funcționalitate în sistemele biologice, asemănătoare în general cu un buton de cămașă. La bacteriile Gram negative, structura sa este mai complexă, deoarece discurile componente sunt duble, alcătuite din proteine diferite și îndeplinesc funcții diferite. Se disting următoarele discuri, așezate pe o structură axială, fină:

- discul M (mobil) este ancorat în structura membranei citoplasmatice;
- discul S (stator) este legat de peptidoglican;
- discul P este localizat în spațiul periplasmic;
- discul L este legat de lipopolizaharidele membranei externe a peretelui.

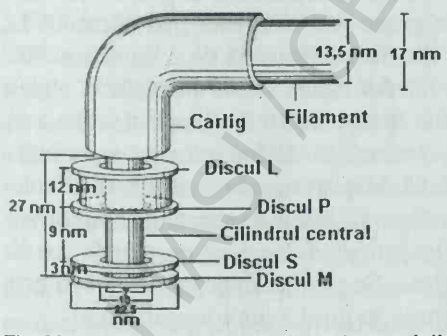


Fig. 23. Reprezentarea schematică a 'motorului' rotativ al flagelului de *E. coli*. 'Rotorul' este un disc proteic integrat în membrana plasmatică și se rotește cu circa 100 revoluții/secundă, față de discul stator, sursa de energie fiind gradientul de protoni (după Todar, 2004).

Cârligul are rolul de articulație flexibilă între corpusculul bazal și filamentul extern. Prin axul său central, cârligul se leagă de corpusculul bazal.

Mișcarea de rotație a discului M (3000–4000 r/min) este transmisă cârligului și filamentului extern.

În alcătuirea flagelului intră cel puțin *11 tipuri de molecule proteice*: câte unul în filamentul extern și cârlig și cel puțin 9 tipuri de proteine în corpusculul bazal. Cea mai cunoscută este proteina filamentului extern, denumită *flagelină* (gr. mol. 40 kDa). Moleculele sale sunt așezate după o simetrie *helicală*, formând o structură tubulară, canaliculară. Moleculele de flagelină au proprietatea de *autoasamblare*: dacă moleculele de flagelină sunt dispersate, în condiții adecvate ele se reasamblează spontan.

BIBLIOTECA UNIVERSITY BRAȘOV

Flagelina se sintetizează sub forma monomerilor, în interiorul celulei. Moleculele de flagelină străbat *axul central* al structurii bazale şi se aşează la *capătul distal* al flagelului, după o simetrie helicală, pentru a forma filamentul extern. Flagelul bacterian creşte prin regiunea sa apicală. Moleculele de flagelină *nu sunt eliberate* în mediul extracelular înainte de a fi asamblate în structura flagelului.

Cârligul este format din subunităţi proteice identice. Funcţia sa nu este cunoscută.

Corpusculul bazal are o structură moleculară mult mai complexă. Cele 9 proteine diferite sunt organizate în discurile care înconjură un ax subţire, ce se inseră structurii flagelului,în membrana citoplasmatică.

2.10.2. Motilitatea şi chimiotaxia

Motilitatea bacteriană are două particularităţi: este foarte *rapidă* şi se face după o direcţie *aleatorie*. Motilitatea a fost studiată cu ajutorul unui microscop special (microscop de urmărire) la o mutantă monoflagelară de *E. coli*.

Cercetările de reologie* au arătat că în mediul nutritiv lichid (bulion), celula bacterină întâmpină o rezistenţă foarte mare, pe care o depăşeşte. Explicaţia rezidă în metabolismul foarte intens al celulei bacteriene şi în natura particulară a sursei de energie utilizată. Pentru mobilitate, celula bacteriană nu utilizează ATP, ci *energia electrochimică*, adică fluxul de electroni care străbate regiunea bazală a motorului rotativ. Energia de rotaţie a structurii bazale este energia protonică (chemiosmotică) generată de deplasarea protonilor prin membrana celulară, care furnizează forţa inegalabilă de deplasare a celulei bacteriene.

* Reologia studiază forţele de frecare care se opun deplasării corpurilor solide în mediile lichide, în funcţie de vâscozitatea acestora.

Celulele de *Proteus* (la origine, termenul se referea la zeul grec al mării, care ia multiple înfăţişări pentru a se face nevăzut) se deplasează pe suprafaţa mediului solidificat prin *roire* (*swarming*). Roirea se produce pe o suprafaţă solidă care nu permite mişcarea flagelară obişnuită în mediul lichid. Studiile de roire pe agar încep prin uscarea suprafeţei agarului pentru a îndepărta umiditatea. Astfel este împiedicată migrarea prin deplasarea în mediul lichid.

Procesul roirii cuprinde următoarele evenimente: a) *creşterea celulelor roitoare*; b) *migrarea lor pe suprafaţa agarului*; c) *diviziunea lor în celule scurte*.

Comportamentul cunoscut sub denumirea de *roire* poate fi descris ca o mişcare a celulelor alungite şi flagelate pe suprafaţa mediului solid, în cicluri periodice de mişcare şi consolidare. Celulele care roiesc suferă importante modificări morfologice. Roirea este determinată de apariţia celulelor filamentoase (20–80 μm lungime), cu un număr mare de flageli (500–1000 flageli/celulă), denumite *celule roitoare*. În timpul consolidării, celulele roitoare se divid pentru a produce celule scurte (2–4 μm lungime, cu 1–10 flageli) care cresc şi se divid o perioadă de timp, apoi se diferenţiază pentru a forma o altă generaţie de celule roitoare. Celulele roitoare apar la periferia coloniei, pe suprafaţa liberă, în grupe mici, care se deplasează pe o distanţă scurtă şi se întorc din nou la colonie. Pe măsură ce perioada de roire creşte, celulele se deplasează în grupe mai mari, tot mai departe de colonie, înainte de a se reîntoarce. Deplasarea în grupe mai mari este mai eficientă. La terminarea primei perioade de roire, mişcarea se opreşte şi celulele intră într-o perioadă de consolidare. Din celulele filamentoase, prin diviziune transversală în câteva puncte rezultă celule scurte normale. Celulele scurte rezultate prin diviziunea celulelor roitoare cresc şi se divid şi ciclul se repetă cu a II-a bandă de roire, care începe de la marginea primei benzi. Fenomenul se numeşte *zonare* şi continuă până când întreaga supra-faţă a plăcii este acoperită de câteva benzi concentrice de creştere densă şi laxă. Mişcarea poate fi rezultatul chimiotaxiei negative faţă de cataboliţii care se acumulează, sau al chimiotaxiei pozitive faţă de substanţele nutritive.

La spirochete, mişcarea este rezultatul contracţiei şi relaxării unui *fascicul de fibrile axiale* (axostil), situate între corpul celulei şi o membrană ce acoperă celula. Se produc mişcări pulsatorii prin flexia şi extensia celulei, precum şi o mişcare concomitentă de rotaţie în jurul axului longitudinal.

2.11. Fimbriile

Fimbriile sunt structuri de tipul unor apendice filamentoase, rigide sau flexibile şi neuniforme ca lungime, care se extind de la suprafaţa celulei bacteriene.

Termenul de fimbrii a fost introdus de Duguid (1955) (lat. = *fibra, franjuri*), iar în 1959 Brinton a folosit termenul de pil (lat. *pilus* = păr). Apoi s-a sugerat ca termenul de pil să fie folosit pentru structurile filamentoase codificate de plasmidele conjugative, cu rol în procesul de conjugare ce constă în transferul unui fragment de ADN de la o celulă donor la o celulă receptoare. Adeseori, cei doi termeni se folosesc pentru a descrie aceiaşi structură. Fac excepţie structurile fimbriale de la *Neisseria*, pentru care literatura foloseşte termenul de pil.

Fimbriile sunt alcătuite din molecule proteice de *fimbrilină*, cu gr. mol. de 15–30 kDa, aşezate totdeauna după o simetrie helicală. După sinteză, fimbrilina este transferată extracelular şi depusă *la baza fimbriei*. Numărul lor este de până la 1000/celulă. Dacă sunt numeroase, au o dispoziţie *pericelulară*. Dacă sunt puţine, au localizare *polară* sau *bipolară*. Lungimea lor este foarte variabilă (1–20 μm), ceea ce sugerează că au vârste diferite.

Fimbriile se observă la microscopul electronic, după *coloraţia negativă* a celulelor întregi sau se evidenţiază indirect prin capacitatea lor de a *aglutina* hematiile diferitelor specii de animale şi pot fi împărţite în 3 categorii *structurale*:

- fimbrii *rigide*, cu diametrul de 5–10 μm, cu un lumen de circa 2 nm (la enterobacterii). Regiunea hidrofobă este la capătul COOH al fimbrilinei;
- fimbrii *flexibile*, cu diametrul de 5–6 μm. Se mai numesc fimbrii N-metil-fenilalanină, deoarece la capătul N-terminal al fimbrilinei au un rest de fenilalanină metilată. Se găsesc la *Ps. aeruginosa, N. gonorrhoeae, N. meningitidis*. Regiunea N-terminală este hidrofobă;
- fimbrii *flexibile subţiri spiralate*, cu diametrul de 4 μm sau mai puţin, fără lumen (K_{88}, K_{99}, la *E. coli*).

Unele fimbrii au atât o regiune rigidă, cât şi una flexibilă.

Fimbriile sunt comune la bacteriile *Gram negative* şi mai rare la bacteriile Gram pozitive (*Corynebacterium, Actinomyces)*, dar sunt diferite structural.

O bacterie posedă câteva tipuri de fimbrii, în funcţie de grosime, lungime, specificitatea antigenică (determinată de secvenţa aminoacizilor în molecula de fimbrilină) şi de specificitatea receptorilor glicoproteici ai celulelor epiteliale de care aderă.

Cea mai importantă *funcţie* care li se atribuie ar fi aceea de *punţi de aderenţă intercelulară* sau aderenţă de suportul inert. La bacteriile din mediile aquatice, fimbriile favorizează asocierea celulelor şi astfel se formează pelicule fine (filme) de *neuston* la suprafaţa apei, cu rol adaptativ, ce asigură condiţii bune de aerare pentru bacteriile aerobe şi de luminozitate pentru cele fotosintetizante.

Pentru bacteriile patogene, prezenţa fimbriilor (tulpinile *fim*$^+$) le conferă un grad superior de virulenţă, deoarece fimbriile aderă ferm la receptorii suprafeţei celulelor epiteliale ale mucoaselor şi ai hematiilor.

Receptorul major al suprafeţei celulelor eucariote pentru fimbriile bacteriene este o *glicoproteină cu manoză.*

În funcţie de comportamentul în prezenţa manozei, *in vitro,* s-au identificat *fimbrii manozo-sensibile* şi *manozo-rezistente*. La *E. coli* s-au evidenţiat fimbrii *manozo-sensibile* (manoza inhibă hemaglutinarea, *in vitro*, prin competiţia cu receptorii suprafeţei hematiilor).

Fimbriile *manozo-rezistente* aglutinează numai eritrocitele tanate. Celulele bacteriene cu astfel de fimbrii aderă la celulele endoteliale, la celulele epiteliale ale tractului respirator, urogenital, la membrana bazală a tubilor renali, a capsulei Bowmann.

O celulă bacteriană exprimă simultan *fimbrii* cu specificităţi multiple de legare la suportul celular. Astfel se explică *selectivitatea* bacteriilor patogene şi comensale pentru anumite gazde şi ţesuturi.

Elaborarea conceptului adezinelor şi a specificităţii lor de legare explică *tropismul tisular selectiv* al bacteriilor infecţioase. Caracterul progresiv ascendent al infecţiei urinare, de la vezica urinară spre rinichi, împotriva fluxului urinar, se explică prin fenomenul de aderenţă, mediat de *fimbrii cu diferite specificităţi de legare*, de celulele epiteliale.

Exprimarea fimbriilor pe suprafaţa celulei este *adaptativă*. Ele favorizează aderenţa celulei bacteriene la substraturi celulare diferite.

Fimbrilina este codificată de *gene cromosomale*, ceea ce denotă că fimbriile au o importanţă ecologică deosebită, prezenţa lor fiind asociată cu anumite condiţii favorizante de mediu.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Orice linie bacteriană poate să existe alternativ în varianta *fim*$^+$ sau *fim*$^-$ şi să poarte simultan mai multe tipuri de fimbrii, cu specificităţi diferite de legare. Rata de mutaţie a genelor care codifică sinteza fimbriilor este foarte mare, astfel încât celulele *fim*+ trec în varianta *fim*- şi invers, prin retromutaţie.

Uneori fimbriile suferă fenomenul *variaţiei de fază şi al variaţiei antigenice*. Variaţia de *fază* înseamnă că o structură dată este sau nu produsă. Variaţia *antigenică* semnifică faptul că aceeaşi structură se produce în variante biochimice diferite.

Variaţia antigenică a fimbriilor bacteriene este rezultatul acţiunii mai multor mecanisme. Cel mai simplu este acumularea lentă a mutaţiilor punctiforme în gena codificatoare. Fenomenul se numeşte *drift antigenic* şi are loc atât la bacteriile patogene cât şi la cele nepatogene.

Semnificaţia biologică. Fimbriile sunt structuri din categoria *adezinelor*, care mediază interacţiunea celulă-suport. În ceea ce priveşte capacitatea de legare, cele mai multe adezine fac parte din familia *lectinelor*[*].

[*] Lectinele sunt glicoproteine care se leagă nespecific cu glucidele sau cu grupările glucidice ale glicoproteinelor. Ele precipită polizaharidele si glicoproteinele sau aglutinează celulele. Activitatea lor aglutinantă şi precipitantă poate fi inhibată de haptene (monozaharide şi oligozaharide).

2.12. Pilii

Pilii sunt apendice filamentoase neflagelare, a căror sinteză este codificată de gene localizate în structura unor plasmide denumite *conjugoni sau plasmide sex*.

Celulele purtătoare de pili au capacitatea potenţială de a dona material genetic (sunt celule "mascul"). Numărul pililor pentru o celulă este cuprins între 1 şi 10, iar lungimea este de circa 20 µm. Diametrul extern este de 6–15 nm, iar cel intern de 2,5 nm.

Pilii sunt alcătuiţi din molecule identice de *pilină*, o fosfoglicoproteină de 12–15 kDa. Se sintetizează în celulă, de unde este transferată în lumenul piliar şi este asamblată după o simetrie helicală, la extremitatea liberă a acestuia.

Pilii pot fi îndepărtaţi mecanic, prin agitare, dar se pot resintetiza. Prin încălzire sau tratament acid, pilii se dezagregă în moleculele componente (pilina). Restabilirea neutralităţii şi a nivelului termic permite *autoasamblarea* şi formarea unei structuri identice cu pilul original.

Rolul pililor. Prezenţa pililor este asociată totdeauna cu procesul de *conjugare* bacteriană. Pilii ar putea fi structuri esenţiale de transfer al materialului genetic de la celula donor la celula receptor. Molecula de ADN ar trece prin lumenul pilului.

După alţi autori, pilii ar avea numai rolul de a "agăţa" celula receptoare de material genetic, iar prin retracţia sa ulterioară, cele două celule s-ar apropia.

Rolul pililor în conjugare este argumentat de faptul că depilierea (prin agitare cu perle de sticlă) este însoţită de pierderea capacităţii de conjugare şi de restabilirea ei odată cu resinteza pililor.

Capacitatea de sinteză a pilinei se pierde odată cu pierderea plasmidei de sex şi este redobândită odată cu recâştigarea plasmidei.

Pilii poartă receptori de fagi. Pe suprafaţa pililor se găsesc receptori pentru fagii "ARN masculi". Se numesc fagi "masculi" deoarece infectează numai celulele cu potenţialitate de donor de material genetic. "Marcajul" cu fagii "ARN masculi" este modalitatea de a-i distinge de alte structuri filamentoase. La extremitatea liberă a pililor se găsesc receptori pentru fagii filamentoşi.

2.13. Dinamica (evoluţia) unei culturi bacteriene

Cultura bacteriană este rezultatul creşterii şi multiplicării într-un mediu lichid sau solid, a unei mici cantităţi iniţiale de celule, care constituie *inoculul*.

Microorganismele se cultivă în mai multe scopuri:

- izolarea si identificarea lor;
- menţinerea viabilităţii lor în colecţie;
- studiul sensibilităţii la antibiotice în laboratorul clinic sau în scopul cercetării;

BOTANY UNIVERSITY LIBRARY

– în scop industrial pentru obținerea *biomasei*, a unor produși de *biosinteză* sau de *fermentație*.

Există două modalități de cultivare a microorganismelor și tot atâtea tipuri de culturi:

– culturile bacteriene *discontinue* se obțin prin cultivarea în mediul nutritiv lichid sau solidificat, ce nu se reînnoiește;
– culturile bacteriene *continue* se obțin prin cultivarea în mediu lichid reînnoit permanent, cu o anumită rată.

În mod curent, în laborator se obțin culturi bacteriene *discontinue*, într-un volum fix de mediu lichid sau solidificat, nereînnoit. Odată cu creșterea culturii bacteriene, compoziția chimică a mediului se modifică: scade cantitatea de substanțe nutritive și se acumulează cataboliți, care pot fi toxici.

Într-o cultură discontinuă, numărul de celule viabile variază continuu. Ritmul de diviziune este condiționat de concentrația nutrienților: este foarte înalt în faza inițială a evoluției culturii, când mediul oferă condiții optime, dar se diminuează treptat, până la 0, pe măsura epuizării nutrienților și a acumulării cataboliților.

Într-o cultură discontinuă, ciclul celular este *sincron* numai în primele cicluri de diviziune celulară Curând apar decalaje și ritmul diviziunii devine *asincron*. Diferite grupe de celule se găsesc în faze diferite ale ciclului de creștere și multiplicare. Vârsta celulelor unei culturi discontinui este diferită. Numărul de generații celulare este limitat.

Analiza evoluției numărului de celule într-o cultură discontinuă se poate face pe o curbă de creștere, trasată în coordonate semilogaritmice. *Panta* curbei reflectă valoarea ratei de creștere, variabilă în timp. *Curba* reflectă variațiile numărului de celule și implicit ale masei celulare, în funcție de timp.

În raport cu *variațiile ratei de creștere*, pe curbă se disting 6 momente:

1) *Faza de latență* (de lag sau de creștere 0) este greu de delimitat de faza următoare (fig. 24). Are o durată foarte variabilă: poate să fie foarte scurtă (chiar inexistentă) sau să dureze câteva ore. Numărul celulelor ramâne neschimbat, egal cu cel din inocul sau poate chiar să scadă ușor. Este caracterizată printr-o intensă activitate celulară. În cursul acestei faze, celulele se pregătesc pentru procesele de multiplicare care vor urma.

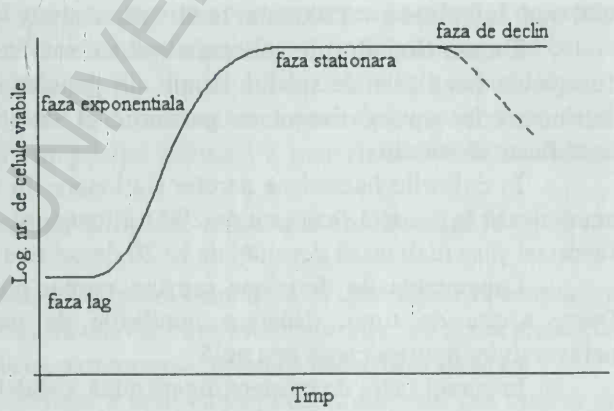


Fig. 24. Curba ideală de creștere a unei culturi staționare. Linia continuă reprezintă numărul total de celule, iar linia discontinuă ilustrează numărul celulelor viabile.

Timpul de latență este lung (1–3 ore) pentru inoculul bacterian care provine dintr-un mediu complex, ce conține numeroși compuși organici, însămânțat într-un *mediu sintetic minimal*. Latența corespunde timpului necesar sintezei enzimelor celulare pentru biosinteza metaboliților esențiali. Latența este de asemenea îndelungată, după inocularea unui mediu sintetic minimal, cu un număr mic de celule care provin din același mediu. În acest caz, bacteriile sunt adaptate fiziologic la mediul de creștere, dar creșterea întârzie, deoarece anumite componente toxice (de exemplu, ionii metalici) nu au fost neutralizate.

Timpul de latență depinde de starea fiziologică a celulelor din inocul: celulele aflate în faza staționară se adaptează ușor la un mediu diferit. Dacă inoculul provine dintr-o cultură aflată în faza de declin, alterarea proceselor fiziologice se reflectă în creșterea perioadei de latență. Timpul de latență nu influențează durata celorlalte faze de evoluție a unei culturi.

De cele mai multe ori, celulele bacteriene se adaptează la noile condiții de mediu datorită *plasticității fenotipice*, în cadrul aceleiași norme genetice. Uneori, adaptarea unei culturi la noile condiții de mediu se poate datora *selecției unei populații mutante* și timpul de lag este lung. În acest caz, în inocul se găsește o proporție foarte mică de celule *mutante*, capabile să metabolizeze aceste surse. Din punct de vedere genetic, mutantele sunt diferite de restul celulelor. Din această cauză, perioada de lag este foarte lungă. Masa celulară a culturii va deveni vizibilă numai după ce celulele mutante s-au multiplicat într-o măsură suficientă pentru a constitui o proporție semnificativă a

BUCUREȘTI UNIVERSITY LIBRARY

inoculului. În acest caz, perioada de lag este aparentă şi nu reală, deoarece celulele mutante capabile să crească se multiplică exponenţial cu mult înainte ca rezultatul multiplicării să se evidenţieze prin creşterea masei celulare.

Perioada de lag este *foarte scurtă* sau chiar absentă, dacă inoculul este transferat pe un mediu identic. Celulele posedă deja, echipamentul necesar metabolizării mediului respectiv.

2) *Faza de iniţiere a creşterii* este un interval scurt de timp, în care celulele bacteriene cresc şi se divid cu un ritm care creşte progresiv. Este faza de accelerare a ritmului de creştere.

3) *Faza de creştere exponenţială.* Creşterea numărului celulelor bacteriene se face cu o rată exponenţială (geometrică) constantă. Ritmul de diviziune este maxim. Mortalitatea celulară este practic nulă. După fiecare diviziune, numărul celulelor se dublează. Daca Xo este numărul de celule/ml la începutul fazei de creştere exponenţială, numărul de celule se dublează succesiv astfel:

- după o diviziune: $X_1 = 2 \times X_o$;
- după două diviziuni: $X_2 = 2^2 \times X_o$
- după n diviziuni: $X_n = 2^n \times X_0$.

Expresia se poate scrie: $\log X_n = \log X_o + n \log 2$.

Creşterea unei culturi bacteriene se realizează într-un interval de timp dependent de *timpul de generaţie* sau timpul de dublare a numărului de celule.

Timpul de generaţie este intervalul necesar pentru ca o celulă tânără rezultată din diviziune, să crească şi să se dividă şi se măsoară în intervalul de timp dintre două diviziuni.

La bacterii, timpul de generaţie se exprimă în minute sau ore: la *B. subtilis, B. megatherium* – 9–10 min; la *E. coli* – 20 min; la *Lactobacillus* – 100 min; la levuri – 60–120 min; la *Paramecium* – 600 min; la *Amoeba* – 1400 min; la *M. tuberculosis* – 1600 min; la *T. pallidum* – 2000 min.

Durata timpului de generaţie este diferită de la o specie la alta şi este controlată genetic. În funcţie de condiţiile de mediu, timpii de generaţie sunt diferiţi pentru aceeaşi tulpină bacteriană. Într-un mediu optim, timpul de generaţie al unei specii se scurtează, dar creşte mult în condiţii modificate de mediu.

În culturile bacteriene aerobe staţionare, în mediul lichid, numărul maxim de celule care se acumulează în această fază este de 200 milioane/ml. În condiţii de agitare, contactul cu nutrienţii este favorizat şi se realizează densităţi de 10-20 de ori mai mari.

Capacitatea de diviziune ramâne numai potenţială şi se realizează numai pentru intervale foarte scurte de timp, deoarece condiţiile de mediu devin foarte rapid limitante. În condiţii nefavorabile, multiplicarea este nulă.

În cursul fazei de creştere logaritmică, celulele prezintă câteva particularităţi: sunt uniforme ca mărime şi puţin mai mari faţă de dimensiunile tipice speciei respective. Se colorează omogen deoarece nu conţin incluzii şi sunt intens bazofile.

Într-o celulă care creşte, circa 80% din ARN total este ARN ribosomal, iar restul este reprezentat, în cea mai mare parte, de ARNt. ARNm, deşi îndeplineşte funcţia de sinteză a proteinelor, are o proporţie foarte mică din ARN total, deoarece funcţionează pentru câteva cicluri ale sintezei proteice, după care, fiind instabil, este degradat.

4) *Faza de încetinire a creşterii* se caracterizează prin diminuarea progresivă a ritmului de diviziune. Este o fază scurtă şi la sfârşitul ei, celulele au încetat să se multiplice şi să crească.

5) *Faza staţionară* (sau de creştere maximală) este caracterizată prin faptul că numărul total de celule rămâne constant. Celulele unei culturi în faza staţionară sunt considerate ca tipice pentru specia respectivă: dimensiunile lor sunt normale (mai mici decât cele din faza precedentă), se colorează normal şi pe baza comportamentului lor în coloraţia Gram sunt atribuite grupului Gram pozitive sau Gram negative. În celule apar substanţe de rezervă, vacuole spori.

Faza staţionară corespunde platoului curbei de creştere. Durata ei este variabilă: în mediile sintetice este scurtă.

Oprirea creşterii este datorată epuizării unui compus nutritiv esenţial, denumit *limitant* al creşterii. Dacă componentele minerale ale mediului sunt în exces, compusul limitant este de obicei energetic. În cazul bacteriilor auxotrofe, în prezenţa componentelor minerale şi energetice, oprirea creşterii se datorează epuizării unui factor de creştere.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6) *Faza de declin* a culturii este ilustrată grafic de panta descendentă a curbei. Masa celulară scade progresiv datorită fenomenului de liză. Cu o rată similară scade numărul celulelor viabile. Cele care nu sporulează mor şi se lizează. Morfologia celulelor este alterată. Într-o cultură de bacili apar forme atipice: sferice, filamentoase, ramificate. Celulele conţin substanţe de rezervă, vacuole. Afinitatea pentru coloranţii bazici se diminuează treptat, odată cu scăderea cantităţii de ARN. Sunt celule îmbătrânite. Numărul lor se micşorează treptat, iar pentru speciile nesporulate tinde repede spre 0 şi cultura se sterilizează.

Creşterea colonială. Bacteriile diseminate individual sau ca grupări elementare pe suprafaţa sau în masa unui mediu nutritiv agarizat, se divid şi formează o *colonie bacteriană.* Fiecare colonie, izolată spaţial de vecinele sale, constituie o *clonă celulară.* Numărul celulelor într-o colonie depinde de talia celulelor şi de rata lor de creştere. Numai celulele situate la periferia coloniei, în contact cu mediul nutritiv sunt metabolic active.

Dacă după fiecare diviziune, cele două celule surori se separă complet, colonia va lua o forma regulată: sferică sau de lentilă biconvexă, pentru cea inclusă în grosimea gelozei şi o formă bombată, netedă, pentru cea de pe suprafaţa agarului. Acestea sunt *colonii S(*Smooth).

Dacă celulele surori aderă între ele, aspectul coloniei devine neregulat, cu suprafaţa încreţită, rugoasă, proprie *coloniei de tip R* (*R*ough).

Măsurarea creşterii se face prin determinări cantitative a doi parametri: masa celulară şi numărul de celule. Ambele măsurători se raportează la un volum fix de mediu, de exemplu la *1 ml.* Masa celulară şi numărul de celule nu sunt în mod necesare echivalente pentru că masa celulelor individuale poate să varieze, masa totală a celulelor creşte continuu, iar creşterea numărului de celule este discontinuă în cazul culturilor sincrone. De obicei, multiplicarea într-o populaţie mare de celule este asincronă şi în aceste condiţii creşterea masei celulare şi a numărului de celule sunt echivalente.

Metoda directă de măsurare a masei celulare este determinarea *greutăţii uscate* a celulelor într-un volum fix de cultură. În timpul creşterii compoziţia chimică a materialului celular rămâne constantă.

Masa celulară se poate determina prin metode indirecte: măsurarea conţinutului în C, N sau în proteine.

Metodele indirecte mai sensibile pentru estimarea masei celulare sunt determinările cantitative ale unei enzime particulare sau ale ratei unui proces metabolic cum este respiraţia sau fermentaţia (de exemplu, rata producerii de acid lactic este folosită ca parametru al creşterii bacteriilor lactice).

Metoda optimă pentru măsurarea masei celulare a unei culturi bacteriene este cea *optică*, ce constă în determinarea cantităţii de lumină dispersată de o suspensie celulară. Capacitatea de dispersie a luminii este proporţională cu densitatea suspensiei celulare. Când o rază de lumină trece prin suspensie, reducerea cantităţii de lumină transmisă permite măsurarea densităţii celulare.

Raportul dintre masa de celule în suspensie şi densitatea sa optică, pentru un organism dat, se face empiric prin măsurarea directă a greutăţii uscate a celulelor într-o probă cu o densitate optică dată.

Determinarea numărului de celule se poate face microscopic, numărând celulele într-un volum determinat. Calculul se face cu ajutorul *camerelor de numărat.* Astfel se determină numărul total de celule dintr-o suspensie.

Numărarea automată a celulelor se face cu un instrument electronic (*coulter counter*). O cantitate de suspensie este trecută printr-un orificiu foarte fin. Detectarea celulelor se bazează pe diferenţele de conductivitate electrică între celulă şi mediul de suspensie. Se înregistrează numărul de celule/unitate de volum. Metoda se utilizează pentru numărarea celulelor mari (protozoare, alge), dar numărarea celulelor mici (bacterii) este dificilă, deoarece orificiul trebuie să fie foarte mic, iar mediul nu trebuie să conţină particule neanimate mici, care pot fi uşor înregistrate ca celule bacteriene.

Numărarea microorganismelor unicelulare se face prin *metoda cultivării* (*viable cell plate count*), pentru că celulele viabile separate spaţial una de alta prin dispersie pe sau într-un mediu agarizat, prin creştere formează *colonii* vizibile macroscopic. Metoda permite numai calculul *celulelor viabile*, deoarece determină numai celulele care cresc şi se divid pe un mediu de cultivare.

2.14. Metabolismul bacterian

Metabolismul (*metabole*, lb. greacă = a schimba) este reprezentat de totalitatea reacțiilor biochimice implicate în activitățile biologice ale celulei bacteriene, prin intermediul cărora substanțele biogene sunt preluate din mediul extern şi sunt supuse reacțiilor producătoare de energie şi de biosinteză.

Substanțele sunt preluate din mediul extern, fie sub formă simplă, utilizabilă direct în metabolism, fie sub formă complexă. Substanțele biogene sunt folosite de celulă în următoarele direcții esențiale:

- pentru sinteza *metaboliților primari* (aminoacizi, baze purinice şi pirimidinice, enzime, acizi graşi), necesari biosintezei constituenților structurali, rezultatul fiind creşterea celulei. Aceşti compuşi se sintetizează în faza de creştere primară, denumită şi *trofofază*;
- pentru *producerea energiei*, în metabolismul energetic şi a produselor metabolismului energetic (produşi de fermentație alcoolică, lactică, butirică, propionică, acidă etc.);
- pentru producerea (uneori) a *metaboliților secundari* (antibiotice, alcaloizi, ergotina, giberelina). Se sintetizează în faza de creştere secundară, denumită *idiofază*, după epuizarea unui nutrient major (sursa de C sau de N). Metaboliții secundari nu sunt esențiali pentru creşterea celulei şi sinteza lor este expresia procesului de diferențiere biochimică.

Reglarea metabolismului bacterian este perfectă şi este subordonată principiului *optimalității* activității celulare, astfel încât pierderea de energie să fie minimă.

Reacțiile metabolice fundamentale ale celulelor bacteriene nu diferă mult de acelea care au loc în celula eucariotă. Totuşi, bacteriile au o serie de particularități metabolice, în special ale *metabolismului energetic*, care este mult mai diversificat decât cel al celulei eucariote.

2.14.1. Particularităţile generale ale metabolismului bacterian

Metabolismul bacterian se distinge de acela al celulei eucariote prin câteva trăsături particulare:

1) Metabolismul bacterian are o *intensitate neobişnuită*, de sute şi chiar de mii de ori mai mare decât metabolismul organismelor superioare, raportat la unitatea de greutate (gramul). Diferitele căi metabolice şi activități enzimatice la bacterii se desfăşoară cu o intensitate deosebit de înaltă, proprie acestor organisme. Particularitatea derivă în cea mai mare parte din valoarea înaltă a raportului *suprafață/volum* (greutate celulară). La bacterii, suprafața este foarte mare în raport cu volumul, ceea ce uşurează schimburile între celulă şi mediu. Suprafața de schimb, prin care substanțele nutritive pătrund în celulă, iar cataboliții sunt eliminați, este foarte mare în raport cu volumul celulei, care reprezintă consumatorul.

2) *Natura substratului* pe care bacteriile îl pot cataboliza este foarte diversă. Bacteriile reprezintă grupul cel mai *omnivor* din întreaga lume vie. Ele metabolizează substanțe inaccesibile pentru alte organisme, de la substanțe anorganice simple, inclusiv substanțe toxice pentru sistemele biologice, până la substanțe organice complexe: cauciucul, asfaltul, fenolii, parafinele, petrolul, lemnul, substanțele antibiotice, cheratina, detergenții, masele plastice. Reprezentanți ai g. *Pseudomonas* pot metaboliza până la 200 substanțe diferite.

3) *Plasticitatea metabolismului* bacterian este fără echivalent în lumea vie şi se referă la capacitatea bacteriilor de a folosi, alternativ, diferite surse de carbon şi energie. Foarte multe microorganisme, considerate ca *strict autotrofe* (capabile să utilizeze numai substanțe anorganice pentru nutriție) sunt de fapt *facultativ heterotrofe* şi pot folosi substanțele organice ca substrat generator de potențial reducător. La rândul lor, microorganismele heterotrofe (organotrofe), în absența substanțelor organice utilizează compuşi anorganici.

4) Corelat direct cu intensitatea metabolismului, *potențialul de sinteză* al celulei bacteriene este deosebit de mare, ca o consecință a faptului că, transcrierea este simultană cu traducerea informației genetice. Dacă potențialul de sinteză, exprimat în kg/zi, în mod convențional, la bovine îl considerăm a avea valoarea 1, la soia este 10, la levuri este 10^5, iar la bacterii este 10^{11}, raportat la

unitatea de greutate. O celulă de *E. coli* sintetizează circa 1000 molecule de proteine/secundă, circa 4000 molecule de lipide şi 4 molecule de ARN. Acest uriaş potenţial de sinteză este numai *teoretic* şi ar putea deveni real numai în condiţii optime de mediu. În condiţii obişnuite de mediu, acest potenţial înalt de sinteză se manifestă o perioadă foarte scurtă de timp, datorită factorilor limitanţi ai mediului: diminuarea cantitativă a nutrienţilor, acumularea rapidă a substanţelor toxice şi de catabolism, modificarea pH, variaţiile de temperatură.

5) Metabolismul bacterian se caracterizează prin *diversitatea căilor catabolice* alternative, prin care poate fi degradat un compus chimic: calea glicolizei, a şuntului hexozo-monofosfaţilor, calea Entner-Doudoroff.

2.14.2. Metabolismul energetic bacterian

Metabolismul celulei bacteriene, ca şi al celulei eucariote, are două compartimente fundamentale:

- căile de producere a energiei, denumite *catabolice sau degradative*;
- căile consumatoare de energie, denumite *anabolice sau de biosinteză.*

Deoarece căile catabolice şi anabolice sunt strâns interconectate prin intermediul unor compuşi cheie ai metabolismului intermediar, adevărate "plăci turnante" ale metabolismului, denumirea comună de "căi amfibolice" este justificată.

La bacterii, datorită ratei foarte înalte a metabolismului, funcţionează o categorie specială de căi, denumite *anaplerotice* (sau de alimentare), menite să aprovizioneze o cale metabolică ce funcţionează intens, cu produsul intermediar necesar.

Căile catabolice reprezintă ansamblul proceselor biochimice prin care are loc degradarea nutrienţilor preluaţi din mediu şi eliberarea energiei. Complexitatea reacţiilor catabolice este variabilă, în funcţie de natura şi complexitatea substanţelor supuse proceselor de degradare.

În general, reacţiile catabolice degradative ale unei macromolecule se desfăşoară în trei faze succesive:

- în *prima fază* au loc reacţiile biochimice catalizate de exoenzime, în cursul cărora macromoleculele nutritive sunt *scindate* în spaţiul extracelular, la subunităţile specifice: glucide, aminoacizi, oligopeptide, nucleozide, fosfaţi organici cu moleculă mică (glicerol-fosfat). Bacteriile, fungii şi protozoarele produc enzime extracelulare cu rol de hidrolaze pe care le elimină în mediu sau rămân legate de structurile de suprafaţă ale celulei: *polizaharidaze* (amilază, celulază, pectinază), *mucopolizaharidaze* (hialuronidază, chitinază, neuraminidază, lizozim), *nucleaze, lipaze, fosfolipaze, proteaze.* Ele hidrolizează moleculele mari, rezultând *oligomeri* sau *monomeri*, pentru care structurile celulare de înveliş sunt permeabile. Pentru microorganismele patogene, exoenzimele reprezintă un factor major de virulenţă, deoarece atacă ţesuturile constitutive ale gazdei;
- în *etapa a II-a*, monomerii sunt degradaţi pe căi *specifice* şi rezultă un număr limitat (circa 12) de molecule mici, denumite *intermediari metabolici* ai căilor centrale, aceiaşi la diferite tipuri de bacterii. În această etapă se eliberează circa 1/3 din energia moleculară;
- în *etapa a III-a, în aerobioză*, reacţiile evoluează în sensul metabolizării integrale a compuşilor, până la CO_2 şi H_2O, cu eliberarea întregii cantităţi de energie; în *anaerobioză*, reacţiile evoluează după modelul *respiraţiei anaerobe* sau al proceselor *fermentative* şi cantitatea de energie care se eliberează este mică.

Reacţiile catabolice sunt *exergonice*: ele realizează tranziţia unei molecule de la o stare mai puţin stabilă, cu un conţinut mai mare de energie, la molecule mai mici şi mai stabile, cu un conţinut mai mic de energie.

2.14.3. Tipuri de metabolism energetic în funcţie de acceptorul final de electroni

Metabolismul energetic este o înlănţuire de reacţii de oxido-reducere, în cursul cărora substratul energetic este oxidat. Reacţiile de oxidare constau într-o dehidrogenare, în care apa are, în acelaşi timp, rolul de donor de O şi de sursă de protoni şi e^-. Toate reacţiile de oxidare biologică au comun faptul că, în esenţă, semnifică o pierdere de e^- de către substrat şi eliberarea energiei. Molecula

care cedează e^- sau protonii (H^+) se *oxidează*, iar cea care îi acceptă se *reduce*. În funcție de natura acceptorului final de e^-, microorganismele pot prezenta trei tipuri de metabolism energetic:

- metabolism energetic de tip *aerob* (oxibiotic) sau *metabolism respirator*, dependent de *citocromii catenei de respirație celulară,* propriu microorganismelor al căror acceptor final de e^-, la capătul catenei de respirație este O_2;
- metabolism energetic *anaerob* (anoxibiotic), caracteristic microorganismelor al căror acceptor final de e^- este un *compus anorganic* oxigenat (nitratul, sulfatul, carbonatul) sau un compus organic (fumaratul) (Zumft, 1997). În prezența O_2, respirația unora dintre aceste microorganisme este de tip aerob, deoarece catena de respirație celulară este funcțională;
- reacții metabolice de tip *fermentativ* sunt acelea care au loc numai în condiții de anaerobioză, dar *acceptorul final de e^- este un compus organic* (de exemplu, piruvatul).

La bacteriile fermentative lipsește lanțul citocromilor din catena de respirație, pentru transportul e^-. Substratul acceptor este redus la produse de fermentație (de exemplu, piruvatul, la lactat). Reducerea acceptorului final este cuplată cu reoxidarea coenzimelor.

Pentru nevoile curente ale *cultivării microorganismelor în condiții de laborator* sunt recunoscute următoarele *tipuri respiratorii*:

- bacterii *strict aerobe* sunt acelea care necesită O_2 molecular ca acceptor final de e^-. Ele realizează metabolism de tip oxidativ și nu cresc în absența O_2. Pentru multe bacterii aerobe este necesară aerarea extensivă, pentru că O_2 este puțin solubil în apă și nu difuzează cu o rată care să egaleze rata utilizării. Aerarea se face prin agitarea viguroasă a recipientului sau prin barbotarea aerului sterilizat în mediul lichid, printr-un tub de sticlă. Bacteriile aerobe cresc mult mai bine în condiții de aerare forțată decât dacă O_2 difuzează liber;
- bacteriile *microaerofile* folosesc O_2 ca acceptor final de e^-, dar concentrația naturală a O_2, de 20–21% este prea mare și din această cauză nu cresc pe suprafața mediului expusă aerului atmosferic, dar nu cresc nici în anaerobioză;
- bacteriile *facultativ anaerobe* își obțin energia pe cale oxidativă, folosind O_2 ca acceptor final de e^-, dar cresc și în condiții de anaerobioză și își obțin energia pe cale fermentativă;
- bacteriile *anaerobe* nu folosesc O_2 molecular ca acceptor de e^-. În interiorul acestui grup se disting câteva diviziuni fiziologice:
  a) bacteriile *anaerobe aerotolerante* cresc slab în condiții de aerobioză, într-o ambianță care conține între 2–8% O_2. Creșterea optimă are loc în anaerobioză (de exemplu, bacteriile lactice);
  b) bacteriile *anaerobe obligate* variază în privința sensibilității lor la O_2: unele tolerează cantități mici de O_2, iar altele strict anaerobe nu cresc în prezența unei concentrații mai mari de 0,5% O_2.

Efectul toxic asupra bacteriilor anaerobe îl exercită O_2 și nu potențialul redox ridicat al mediului. În prezența O_2, bacteriile anaerobe își pierd viabilitatea deoarece nu pot să detoxifice intermediarii toxici ai reducerii O_2: H_2O_2, O_2^- (radicalul superoxid), OH^- (ionul hidroxil), $OH^\cdot$ (radicalul hidroxil), $^1O_2$ (oxigen singlet*).

*$^1O_2$ se formează după ce molecula de O_2 absoarbe o cantitate de energie. În molecule, în general, e^- apar în perechi stabilizate, cu spini de direcție opusă. O_2 este o moleculă neobișnuită, prin faptul că spinii electronilor au aceeași direcție. Absorbția energiei schimbă unul dintre e^- pe un orbital cu energie mai înaltă și se produce inversia spinului.

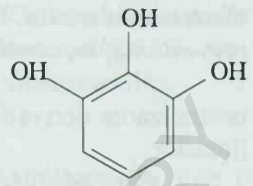
Multe bacterii strict anaerobe sunt bogate în flavine (enzime), care pot reacționa spontan cu O_2 și forma produse toxice. Din această cauză, cultivarea lor se face în recipiente din care O_2 se elimină complet, pentru a crea un potențial redox scăzut.

Există numeroase procedee pentru *diminuarea conținutului de O_2*:

- unele simple (umplerea recipientelor cu mediu și acoperirea cu dop de cauciuc), pentru bacteriile care tolerează o concentrație mică de O_2 în mediu;
- altele mai complexe pentru cultivarea bacteriilor strict anaerobe: în mediul de creștere se adaugă *agenți reducători* (acidul tioglicolic, cisteină) sau alături de placa cu mediu, în atmosfera închisă a recipientului de cultivare (pirogalolul).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Agenţii reducători reacţionează cu O_2 dizolvat în mediu sau existent în atmosfera recipientului şi-l reduc la H_2O.



Pirogalolul

2.14.3.1 Respiraţia aerobă

Respiraţia aerobă este procesul catabolic producător de energie în cursul căruia compuşii energetici organici sau anorganici reduşi, cu rolul de *donori* de e^-, sunt degradaţi complet pe cale oxidativă până la CO_2 şi H_2O. În respiraţia aerobă, O_2 este ultimul acceptor de e^- (fig. 27).

Trăsătura distinctivă a procesului respirator este prezenţa mai multor *sisteme redox,* constituite din enzime care alcătuiesc *catena transportoare de* e^-. Electronii sunt transportaţi în cascada enzimelor sistemului redox, permiţând eliberarea treptată a energiei. Lanţul de sisteme redox formează *catena de respiraţie celulară.*

Substratul energetic poate fi *anorganic* pentru bacteriile chimiolitotrofe (H_2, NH_3, nitriţii, S° şi compuşii săi reduşi, compuşii Fe) sau *organic* pentru cele chimioorganotrofe.

Setul de reacţii de importanţă esenţială în respiraţia aerobă este *ciclul Krebs.* Protonii (H^+) cedaţi de diferiţi intermediari ai ciclului Krebs ajung, prin sistemele redox ale *catenei de respiraţie,* la O_2.

Electronii eliberaţi din substrat străbat componentele catenei, până la acceptorul final, O_2 în condiţii de aerobioză sau un *alt acceptor final,* dacă O_2 nu este disponibil. Concomitent se sintetizează ATP. Ansamblul reacţiilor de oxidare şi de fosforilare poartă denumirea de *fosforilări oxidative.*

Testul oxidazei se foloseşte ca un caracter fenotipic pentru identificarea tulpinilor bacteriene cu metabolism respirator de tip aerob. Se determină astfel dacă o tulpină bacteriană produce citocrom-oxidază şi dacă foloseşte O_2 în catena de transport al e^-. Bacteriile care *utilizează* O_2 sunt cele obligat-aerobe, iar cele care *pot* să-l folosească sunt facultative.

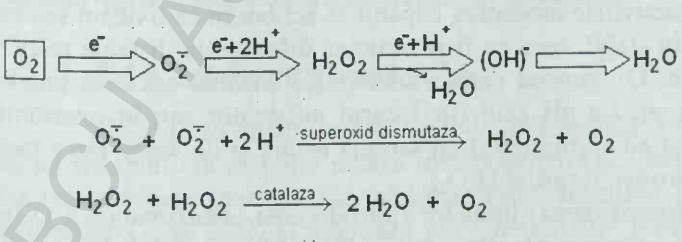
Oxidaza este enzima care catalizează reacţia de oxidare/reducere ce implică O_2 ca acceptor de e^-. În aceste reacţii O_2 este redus la H_2O sau H_2O_2. Oxidazele sunt o subclasă a oxido-reductazelor (glucoz-oxidaza, monoamin-oxidaza, NADPH-oxidaza, xantin-oxidaza, lizil-oxidaza, citocrom P_{450} - oxidaza). *Citocrom* P_{450} *– oxidaza* este enzima cheie componentă a catenei de transport al e^-, ce permite folosirea O_2 în respiraţie pentru generarea energiei.

Mecanisme moleculare protectoare care permit respiraţia aerobă

Multe reacţii biochimice esenţiale pentru metabolismul aerob al celulei necesită transferul a 4 e^- la molecula de O_2 pentru a forma H_2O (după reacţia: $O_2 + 4e^- + 4\ H^+ = 2H_2O$). De cele mai multe ori transferul are loc simultan, fără formarea altor intermediari ai reducerii.

Deoarece O_2 este un oxidant puternic şi acceptor de mare afinitate al e^-, el poate avea rolul de acceptor de e^- nu numai la capătul catenei respiratorii membranare, ci şi în alte reacţii de oxidare a substratului, catalizate de enzimele solubile în citoplasmă. Aceste reacţii pot fi fiziologice, producătoare sau neproducătoare de energie sau sunt nefiziologice şi în anumite condiţii sunt letale, *deoarece* O_2 *molecular este redus secvenţial,* univalent, formând *intermediari reactivi* cu diferite grade de toxicitate. Reducerea O_2 cu un singur e^- produce *radicalul superoxid* (O_2^-), care la pH fiziologic se reduce încă odată univalent şi formează H_2O_2 (produsul reducerii bivalente).

Reducerea completă a unei molecule de O_2 la H_2O, necesită 4 e^-. În acest proces se formează compuşi intermediari (radicalul anionic superoxid (O^-_2), peroxidul de O (H_2O_2) şi radicalul hidroxil (OH^-). Ionul O^-_2 este eliminat de superoxid dismutaze (SOD), iar H_2O_2 este îndepărtată de catalaze şi peroxidaze.



Intermediarii reducerii O_2 reacţionează cu toate tipurile de macromolecule şi produc leziuni ale moleculelor de ADN, ARN, proteine, iar prin peroxidarea lipidelor apar leziuni membranare.

Toate organismele şi-au dezvoltat *mecanisme protectoare* pentru a atenua

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

efectele oxidanților. Mecanismele de apărare a celulei față de stressul oxidativ sunt de două categorii: *preventive și reparatorii.*

Mecanismele preventive acționează prompt și previn apariția leziunilor oxidative, prin neutralizarea derivaților reactivi ai O_2 sau limitează durata unor reacții, ca de exemplu, peroxidarea lipidelor.

Peroxidul de H (H_2O_2) are o toxicitate moderată. Oxidează componentele membranare și enzimele, lezează ADN și produce mutații, inhibă procesele de transport membanar. H_2O_2 este îndepărtată, cel mai adesea sub acțiunea *catalazei* sau a *peroxidazelor*, care o reduc la H_2O, după reacția:

$$2\,H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalaza}} 2\,H_2O + O_2$$

O moleculă de H_2O_2 se reduce, iar alta se oxidează.

Catalaza este o hemoproteină, un homotetramer cu un protohem/subunitate, ce conține 4 grupări hem. Este o enzimă protectoare care catalizează degradarea H_2O_2, prevenind formarea radicalului OH, mai reactiv.

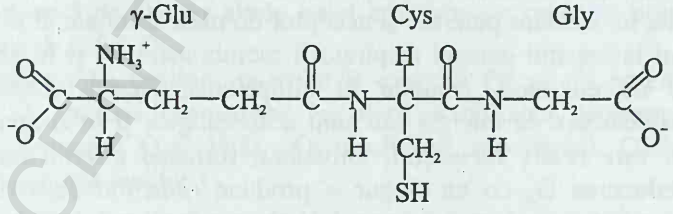
Catalaza se găsește în sânge, măduva osoasă, membranele mucoase, rinichi, ficat. Enzima a dobândit notorietate pentru rolul de activator al izoniazidei, fiind folosită în tratamentul tuberculozei. Pierderea enzimei prin mutație duce la rezistența la izoniazidă, unul dintre motivele creșterii frecvenței tuberculozei.

De cele mai multe ori, este o enzimă neinductibilă. Este produsă abundent de bacteriile aerobe și de cele facultativ aerobe. Cele microaerofile produc cantități mici de catalază. Enzima nu este produsă de bacteriile strict anaerobe și nici de cele anaerobe aerotolerante. Unele bacterii lactice sintetizează totuși o catalază adevărată, dacă în mediu se găsește *hemina*, deoarece ele nu sintetizează grupul prostetic hem al catalazei.

Peroxidazele sunt flavoproteine fără metale grele și catalizează dehidrogenarea unui substrat (AH_2), în prezența H_2O_2. Cea mai importantă este NADH-peroxidaza. Peroxidazele se găsesc la plante, animale și microorganisme și catalizează oxidarea diferitelor substraturi pe seama peroxidului:

$$NADH + H^+ + H_2O_2 \longrightarrow NAD^+ + 2\,H_2O$$

Glutationul este substratul glutation-peroxidazei (GP) care îndepărtează H_2O_2 și peroxizii lipidici care rezultă din atacul radicalilor liberi asupra lipidelor.



Structura glutationului: L-γ-Glutamil- L-Cysteinil-Glycină. Glutationul este compusul tiolic al multor celule procariote și eucariote. Lipsește la eucariotele care nu au mitocondrii.

Ionul O_2^- (superoxid) se formează în cantități mici în timpul procesului respirator normal, prin reducerea univalentă ($O_2 + e^- = O_2^-$). Are reactivitate moderată, capabil să acționeze ca oxidant sau ca reducător în sistemele biologice. Este relativ stabil, ceea ce îi permite să difuzeze la distanțe relativ mari înainte de a-și exercita efectele toxice. O_2^- generat extracelular poate dobândi acces la țintele intracelulare pe calea canalelor pentru anioni. La pH acid (în focarul inflamator sau în interiorul fagosomului), O_2^- se protonează și formează HO_2^- (hidroniu) cu sarcină neutră și de aceea trece mai ușor prin membrane și reacționează cu sine însuși, formând H_2O_2.

O_2^- produce distrugerea oxidativă (peroxidarea) lipidelor (introducerea neenzimatică a O în catenele de acizi grași nesaturați) și a altor componente ale celulei. Este cel mai stabil dintre toți

BUASM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

intermediarii reducerii O_2 şi poate acţiona succesiv, asupra mai multor molecule. O_2^- este eliminat sub acţiunea *superoxid-dismutazelor* (SOD). SOD se combină cu 2 molecule de O_2^-, după reacţia:

$$2\,O_2^- + 2\,H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2 \text{ sau } O_2^- + 2\,H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

Ionul superoxid este eliminat rapid şi nu se acumulează în celulă. Anihilarea O_2^- este o strategie esenţială de apărare, deoarece nu numai că limitează acţiunea sa directă, dar previne reducerea Fe mediată de O_2^- şi generarea OH (Lovely, 1991).

Unii fungi şi puţine bacterii produc în special *CuZnSOD*, homodimere, fiecare subunitate cu câte un atom de Cu şi Zn. Bacteriile anaerobe *obligate* produc în special *FeSOD* (dimeri), iar cele *aerobe* produc predominant *MnSOD* (dimeri şi tetrameri). Unele bacterii produc ambele tipuri de SOD. Unele bacterii patogene (*M. tuberculosis*) secretă FeSOD în mediul extracelular, ca mecanism de rezistenţă la atacul oxidant. La bacteriile facultativ-anaerobe (*E. coli*), SOD este periplasmică şi nivelul activităţii ei creşte după expunerea la O_2.

Singurele organisme care nu posedă enzime protectoare sunt bacteriile anaerobe stricte. De aceea, O_2 exercită efecte toxice letale asupra lor.

Radicalul hidroxil liber (OH) se formează prin *reducerea trivalentă* a O_2 *in vitro,* prin reacţia H_2O_2 cu O_2^-. Această reacţie este amplificată de un catalizator metalic (Fe^{3+}). Radicalul se formează şi ca rezultat al acţiunii radiaţiei ionizante.

OH este cel mai puternic agent oxidant dintre toţi intermediarii reducerii O_2. OH oxidează toate categoriile de macromolecule (proteine, ADN, lipide). Este probabil unul dintre agenţii care omoară celulele după iradiere x sau γ.

Datorită reactivităţii foarte înalte, difuzia OH este limitată înainte de a întâlni substraturile oxidabile. Oxidarea acizilor graşi nesaturaţi într-o membrană lipidică poate produce *radicalul peroxil* (HO_2), care reacţionează cu alte molecule lipidice învecinate, generând alţi radicali lipidici. Se iniţiază reacţia în lanţ a radicalilor liberi, care se propagă la situsuri îndepărtate de situsul primar al reacţiei.

Oxigenul singlet ($^1O_2$) este o formă moleculară cu energie superioară şi se formează când cei doi e^- pereche dobândesc spini antiparaleli, fie că se află pe acelaşi orbital, fie pe orbite diferite. În această formă, O_2 nu primeşte un e^- suplimentar, ci numai *energie* suplimentară, care schimbă spinul unuia dintre e^-.

$^1O_2$ este un poluant atmosferic. Poate fi produs fie spontan, fie prin sisteme enzimatice. Cea mai comună cale chimică a producerii sale este *reacţia O_2 cu lumina vizibilă.* Procesul implică prezenţa unei molecule a unei substanţe colorate care absoarbe lumina.

$^1O_2$ se generează prin acţiunea lactoperoxidazei şi mieloperoxidazei, prezente în lapte, salivă şi în fagocite. În fagocite, $^1O_2$ are rolul de a omorî agentul fagocitat. În prezenţa $^1O_2$ se produc reacţii de oxidare, al căror rezultat este distrugerea oxidativă a componentelor celulare vitale, ca de exemplu, fosfolipidele membranei celulare.

Mecanismele reparatorii acţionează tardiv şi repară leziunile cauzate de molecule reactive care nu au fost anihilate de sistemele de apărare preventivă. Fiecare condiţie de stres induce sinteza unui set de proteine, unic pentru categoria agentului inductor al stresului. Unele proteine induse de stresul oxidativ sunt comune şi pentru alte tipuri de stres (stresul hipertermic, înfometarea etc.).

Stresul oxidativ alterează numeroase căi metabolice. Gradul de alterare este dependent de capacitatea de răspuns al celulei la stres. Eliminarea timpurie a stresului oxidativ, prin mecanismele preventive este esenţială pentru supravieţuirea celulei.

2.14.3.2 Respiraţia anaerobă

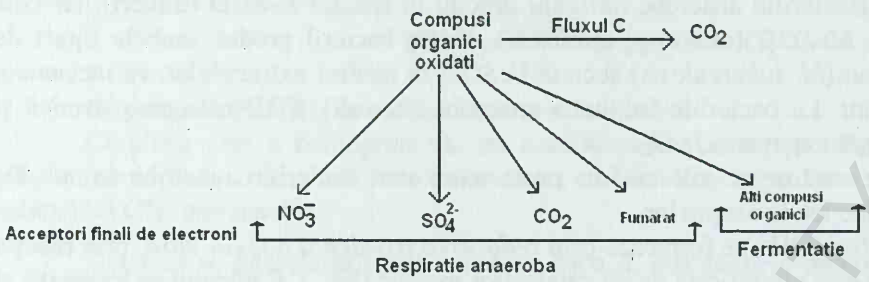
Majoritatea organismelor capabile de respiraţie anaerobă sunt procariote. Bacteriile anaerobe nu au sistemul citocromilor pentru metabolismul O_2. Cele aerotolerante au niveluri scăzute de SOD, iar catalaza este prezentă sau absentă. Dacă anaerobii au SOD şi catalază evită efectul toxic al radicalilor O_2 şi H_2O_2 şi tolerează O_2. Unele dintre bacteriile heterotrofe care realizează respiraţia anaerobă au catenă de respiraţie şi sunt *facultativ anaerobe*. În prezenţa O_2, realizează metabolism

BUASVM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

oxibiotic. Transformările chimice pe care le realizează în timpul generării energiei, în absența O_2, au o deosebită importanță ecologică sau industrială.

În absența O_2, bacteriile heterotrofe facultativ-anaerobe își obțin energia din substratul energetic, fie prin *respirația anaerobă*, fie prin *fermentație*. Respirația anaerobă este mai eficientă din punct de vedere energetic, comparativ cu fermentația.

În procesul respirației anaerobe, e^- cedați de substratul organic oxidabil sunt preluați de catena de respirație celulară și sunt transferați unui acceptor final, care este fie un *compus oxigenat* (*nitrat, sulfat, carbonat*), fie un singur compus organic (*fumaratul*). Transferul e^- de-a lungul catenei respiratorii este cuplat cu fosforilările oxidative membranare.



Acceptorii finali de electroni în respirația anaerobă și în fermentații. Catabolismul compușilor organici produce CO_2.

2.14.3.3. Fermentația

Denumirea de "fermentație" vine din lb. latină (*fervere* = a fierbe) și semnifică degajarea, uneori abundentă, a CO_2 în timpul fermentației. Studiul științific al fermentațiilor a fost inițiat de L. Pasteur. În perioada 1857–1875, el a demonstrat că procesele de transformare biochimică a unor substraturi sunt consecința "vieții fără aer" a unor microorganisme, cu rolul de fermenți.

Din punct de vedere *fiziologic*, *fermentația este un proces catabolic producător de energie în absența O_2, în care compușii organici au rolul de donori și de acceptori de electroni.* Compușii chimici care îndeplinesc aceste funcții sunt, de regulă, metaboliți derivați dintr-un substrat fermentabil (de exemplu, un glucid). Procesele redox se produc în absența oricărui acceptor terminal de electroni.

Din punct de vedere *biochimic*, fermentația poate fi definită ca un ansamblu de reacții biochimice anaerobe de oxidare și de reducere care furnizează celulei energia necesară prin mecanismul *fosforilărilor la nivelul substratului*, care au loc în citoplasmă.

Funcția majoră sau unică a fermentației este cea energetică, adică producerea ATP. ATP rezultă prin transferul grupelor fosfat din intermediarii fosforilați cu potențial energetic înalt ce se formează în timpul degradării substratului.

Fermentațiile se desfășoară în *condiții anaerobe*. La microorganismele strict anaerobe, în prezența O_2, căile fermentative sunt represate și nu se dezvoltă, iar cele facultativ-anaerobe își schimbă calea metabolică de producere a energiei, de la fermentație la respirație. *Inhibiția fermentației în aerobioză* la microorganismele aerobe-facultativ anaerobe, poartă denumirea de *efect Pasteur** și se manifestă prin diminuarea netă a cantității produselor de fermentație, precum și prin creșterea randamentului energetic ce se reflectă în producerea unui volum net superior de biomasă pentru aceeași cantitate de substrat consumat. Efectul inhibitor al O_2 asupra fermentației la microorganismele facultativ anaerobe ar fi datorat inactivării uneia dintre enzimele cheie ale căii Embden-Meyerhof, *fosfofructokinaza*. Numai bacteriile lactice fac excepție: O_2 nu modifică modul lor de a produce energie, astfel încât fermentația continuă chiar în prezența O_2.

*O celulă facultativ-anaerobă metabolizează glucoza pe cale aerobă sau anaerobă. În anaerobioză, glucoza este degradată la lactat, rata degradării fiind mult mai mare decât în condiții aerobe. Diferența se datorează randamentului mai mic de sinteză a ATP/moleculă : în timpul glicolizei se produc 2 molecule de ATP/moleculă, iar în aerobioză se sintetizează 36 molecule de ATP/moleculă. În anaerobioză, pentru sinteza aceleiași mase celulare este necesară de 18 ori mai multă glucoză.

Dacă suspensia celulară anaerobă se oxigenează, rata de consum a glucozei scade foarte mult, iar acumularea lactatului scade până spre 0. Fenomenul inhibării consumului de glucoză și stoparea acumulării lactatului în prezența O_2 se numește *efect Pasteur*. Efectul s-a descoperit pentru fermentația alcoolică, dar este o caracteristică a tuturor celulelor facultative, inclusiv a celulelor musculare.

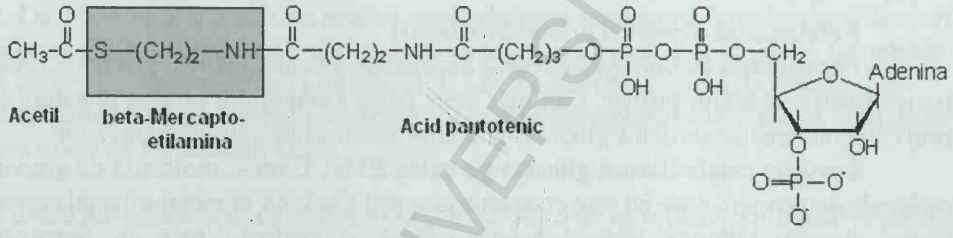
Substraturile fermentabile sunt compuşi organici diverşi: glucide sau compuşi înrudiţi (acizi organici, alcooli), aminoacizi, amine, purine, pirimidine. În procesul fermentaţiei, anumiţi compuşi organici, de obicei doi metaboliţi diferiţi, derivaţi dintr-un substrat fermentabil, au rolul de *donor* şi respectiv, de *acceptor de e*$^-$.

În procesul fermentativ este menţinut *echilibrul redox*. Nivelul mediu de oxidare a produselor finale este egal cu al produsului fermentabil: din glucoză rezultă atât metaboliţi oxidabili, cât şi reductibili.

Degradarea substratului în fermentaţie este *incompletă* şi de aceea se eliberează o cantitate mult mai mică de energie decât în procesul de respiraţie, în cursul căreia oxidarea substratului este completă.

Procesele de fermentaţie sunt iniţiate de *fosforilări la nivelul substratului*. Rezultatul lor este sinteza ATP, dar şi a altor compuşi cu o legătură bogată în energie, cel mai important fiind *acetil-CoA*.

Diferenţa esenţială între metabolismul aerob şi anaerob constă în soarta *acidului piruvic* şi a *NADH*. În metabolismul aerob, NADH este oxidat în catena transportoare de e, cu sinteza ATP prin fosforilare oxidativă, iar în anaerobioză NADH este folosit în reducerea anaerobă a compuşilor organici.



Structura moleculară a acetil – CoA.

Glucoza poate fi fermentată virtual de toate bacteriile anaerobe. Fermentaţia ei este cel mai cunoscut proces fermentativ şi este iniţiat printr-o reacţie de fosforilare, în urma căreia rezultă *glucozo-6 fosfatul*. Se consideră că procesul decurge în două etape:

- în prima etapă se desfăşoară *reacţiile de oxidare* a glucozei. Rezultatul lor este formarea intermediarului central al metabolismului fermentativ al glucidelor – *acidul piruvic*. Acest compus este mai oxidat decât glucoza şi diferenţa de potenţial redox este stocată în piridin-nucleotidele reduse;
- în etapa a II-a au loc reacţii de *reducere a compuşilor intermediari*, prin care se formează mai multe produse finale.

Glucoza este oxidată pe una din următoarele 4 căi:

- *calea Embden-Meyerhoff-Parnas* (EMP, denumită şi calea hexozo-difosfatului sau a glicolizei);
- *calea hexozo-monofosfatului* (HMP, denumită şi calea pentozo-fosfatului);
- *calea fosfocetolazei*;
- *calea Entner-Doudoroff*.

Fermentaţia lactică

Fermentaţia lactică este procesul biologic prin care microorganismele catabolizează glucoza din mediu şi o transformă în acid lactic. În cantitate mică, acidul lactic este produsul de catabolism al unui număr mare de microorganisme, dar unele bacterii furnizează acidul lactic ca produs principal al metabolizării glucidelor.

Bacteriile lactice se împart în două categorii:

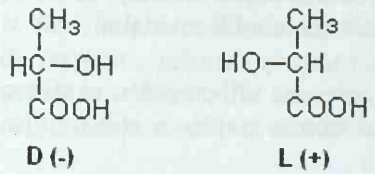
a) bacteriile *homofermentative* produc numai acid lactic ca produs final al procesului fermentativ: *Lactobacillus delbrueckii, L. bulgaricus, L. acidophilus, L. casei, L. plantarum, Streptococcus lactis, S. cremoris, S. thermophilus*;

b) bacteriile *heterofermentative* produc, pe langă acid lactic, cantităţi mari ale altor produse finale (CO_2, etanol, acid acetic, glicerină, manită, în funcţie de specie): *L. brevis, L. lycopersici, Leuconostoc mesenteroides, L. dextranicum, L. citrovorum.*

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cantități mari de acid lactic sunt produse de unii fungi filamentoşi (*Rhizopus*), dar pentru producerea industrială a acidului lactic se folosesc bacteriile lactice.

Bacteriile lactice sunt Gram pozitive, nesporulate, anaerobe-aerotolerante sau microaerofile, mobile, nepatogene şi cresc în mediu acid.



Acidul lactic (α-hidroxipropionic) conține un atom de carbon asimetric şi de aceea poate exista sub două forme optic active: izomerii D (-) şi L (+).

Fermentația aceto-lactică

Bacteriile din genul *Bifidobacterium*, într-o fermentație mixtă aceto-lactică produc un amestec de acizi lactic şi acetic, după reacția:

2 Glucoză ⟶ 3 Acid acetic + 2 Acid lactic

Glucoza este fosforilată şi convertită la fructozo-6 fosfat, ca şi în calea glicolitică EMP. Fructozo-6 fosfatul este clivat într-o reacție de fosforilare cu fosfat anorganic, într-o moleculă de acetil-fosfat şi eritrozo-4 fosfat. Reacția eritrozo-4 fosfatului, cu o moleculă de fructozo-6 fosfat inițiază o serie complexă de rearanjări moleculare, din care rezultă gliceraldehid-3 fosfat şi acetil-fosfat.

Fermentația alcoolică produsă de levuri

Fermentația alcoolică este foarte asemănătoare celei lactice, diferența fiind numai cu privire la transformările acidului piruvic. Cea mai mare parte a etanolului produs în natură şi în industrie rezultă prin catabolizarea anaerobă a glucozei şi a altor zaharuri de către *S. cerevisiae*.

Levurile catabolizează glucoza pe calea EMP. Dintr-o moleculă de glucoză se formează două molecule de *piruvat*, care nu este convertit la acetil-CoA, ca în metabolismul aerob şi nici redus la acid lactic, ci sub acțiunea *piruvat-decarboxilazei*, o enzimă cheie în fermentația alcoolică, este decarboxilat la *acetaldehidă*. Acetaldehida este redusă de NAD-reductază, la *etanol*.

Producția netă de ATP în fermentația alcoolică este de două molecule pentru fiecare moleculă de glucoză, mult mai mică decât în catabolizarea aerobă.

Prin transferul celulelor în condiții anaerobe, rata degradării glucozei se intensifică de 3-4 ori. Transferul invers este însoțit de diminuarea ratei de catabolizare a glucozei şi oprirea fermentației alcoolice. Fenomenul poartă denumirea de "efect Pasteur".

Fermentația alcoolică bacteriană

O altă cale a fermentației alcoolice este aceea care se desfăşoară în celulele bacteriene saprobionte anaerobe, aerotolerante, ce aparțin genului *Zymomonas*. Glucoza este catabolizată pe calea Entner-Doudoroff (ED).

Calea ED a fost descoperită la *Pseudomonas saccharophila* şi la *Zymomonas mobilis*, dar este funcțională şi la unii viermi paraziți.

Primul intermediar al căii este *glucozo-6 P*, care este oxidat, ca şi pe calea HMP, la *6-fosfo-gluconat*.

Prin reacția de dehidrogenare, 6-fosfo-gluconatul formează un compus intermediar – *2-ceto-3-dezoxi-6-fosfo-gluconatul*, care este scindat sub acțiunea *aldolazei, la piruvat şi aldehida-3-fosfoglicerică*.

Aldehida-3-fosfoglicerică poate fi catabolizată de enzimele căii EMP şi rezultă piruvat sau de enzimele căii HMP şi se formează precursori pentru biosinteza ADN, ARN, a vitaminelor, aminoacizilor aromatici etc. Calea funcționează şi la *Rhizobium*. Lipseşte la bacteriile Gram pozitive, cu excepția unora din g. *Nocardia*.

Bacteriile din g. *Zymomonas* metabolizează piruvatul prin decarboxilare, deoarece au o enzimă rară la bacterii – *piruvat-decarboxilaza*. Pe această cale, dintr-o moleculă de glucoză se formează două molecule de *etanol* şi două molecule de CO_2.

Multe bacterii lactice, enterobacterii şi clostridii formează cantități mari de piruvat în procesul fermentației, dar nu au piruvat-decarboxilază pentru producerea acetaldehidei.

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Catabolismul piruvatului

Piruvatul este catabolizat pe cale aerobă sau anaerobă. Microorganismele strict aerobe sau cele facultative, realizează în prezența O_2 decarboxilarea oxidativă a piruvatului și formează acetil-coenzima A, care intră în ciclul Krebs, la nivelul oxalo-acetatului.

În anaerobioză, piruvatul este decarboxilat sub acțiunea piruvat-decarboxilazei și se formează acetaldehidă și CO_2, redusă ulterior la etanol, de către bacteriile din genul *Zymomonas*.

Piruvat-decarboxilaza poate fi asociată cu un sistem transportor de electroni, până la CO_2.

Fermentațiile acide

La cele mai multe bacterii, catabolizarea glucozei la acid piruvic se desfășoară pe calea EMP.

Există câteva tipuri de fermentații care se deosebesc de fermentația homolactică prin reacția de reducere a *piruvatului*, deoarece numai o parte a acestui intermediar este redusă direct la *lactat*, dar majoritatea moleculelor sale sunt supuse unei reacții de *decarboxilare*, sub acțiunea piruvat decarboxilazei. Se formează *acetaldehida*, care este oxidată în trepte succesive, rezultatul fiind un amestec de produse de fermentație în care predomină *acizii*.

Echilibrul cantitativ al produselor finale depinde de echipamentul enzimatic al speciei bacteriene, dar și de un mecanism general de reglare a metabolismului bacterian, în funcție de pH-ul mediului de creștere. Dacă pH-ul scade sub un anumit nivel, datorită producerii inițiale a *acizilor tari* (acetic, lactic), metabolismul bacterian este reglat spre producerea *acizilor mai slabi* (propionic, butiric) și în anumite cazuri, a corpilor *cetonici* (butanediol) sau a *alcoolilor* (etanol, butanol).

Cele mai multe fermentații bacteriene sunt acide. În funcție de raportul cantitativ al produselor finale se disting câteva tipuri de fermentații acide.

Fermentația acidă mixtă este caracteristică unui număr mare de enterobacterii negative pentru reacția Voges-Proskauer și se caracterizează prin acumularea de acetil-metil-carbinol ($CH_3 - CO - CHOH - CH_3$). În varianta sa cea mai simplă, fermentația acidă mixtă este rezultatul a două serii principale de reacții:

- *reducerea* directă a *piruvatului la lactat*;
- *clivarea piruvatului la formiat și acetil*, în prezența CoA.

Produsele finale ale fermentației acide mixte sunt lactatul, acetatul, etanolul și formiatul. Consecutiv clivării formiatului, la multe enterobacterii (*E. coli*), din fermentația glucozei rezultă gaze (CO_2, H_2). Dacă din echipamentul enzimatic lipsește *formiat-liaza*, fermentația se produce fără gaze.

Unele enterobacterii, în special cele care au formiat-dehidrogenază, produc o cantitate mică de *acid succinic*, în prezența ATP, prin reacția de condensare a unei molecule de CO_2 cu o moleculă de piruvat. Reacția este catalizată de piruvat-feredoxin-oxidoreductază.

Proporția produselor finale ale fermentației depinde de condițiile de cultivare. Valoarea pH a mediului scade datorită acumulării acizilor rezultați în fermentație.

Fermentația butirică este caracteristică, dar nu exclusivă, bacteriilor zaharolitice din g. *Clostridium*. Butiratul se formează pe o cale metabolică ce începe cu clivarea *piruvatului*, în prezența CoA, în acetil-CoA, CO_2 și H_2. CO_2 și H_2 se formează direct, fără faza intermediară a acidului formic.

Conversia piruvatului la acetil-CoA implică sistemul enzimatic al *piruvat-feredoxin-oxidoreductazei* (PFO), o enzimă ce catalizează oxidarea piruvatului pentru a forma acetil-CoA și CO_2. Feredoxinele sunt proteine mici, foarte acide, cu rolul principal de transportori de e^-, care conțin ca grupări prostetice aglomerări de metale: 2Fe-2S, 4Fe-4S sau 3Fe-4S. Au potențial redox mic și funcționează ca transportori de e^- în procese metabolice fundamentale ca fotosinteza, fixarea N_2, asimilarea H_2 și S. Electronii pot fi donați unei hidrogenaze, cu formarea H_2. Cele mai comune feredoxine bacteriene conțin 2 aglomerări de metale într-un lanț peptidic de 50–60 de resturi, sunt specifice anaerobilor și au rolul de transfer al e^- în sistemele cu potențial redox scăzut.

PFO are un rol important în procesele de oxido-reducere ale bacteriilor anaerobe (*Clostridium*). Enzima permite reutilizarea H_2 ca potențial reducător, având rol de hidrogenază de înglobare. Are un potențial redox foarte mic, asemănător cu al H_2 (-0,42 V). Funcția de hidrogenază de înglobare a PFO catalizează reducerea produselor primare acide ale fermentației mixte, rezultate din

acidul piruvic, la molecule neutre: prin reducerea aceto-acetilului rezultă butanol, prin decarboxilarea aceto-acetil-CoA se formează acetona, iar prin reducerea acetonei rezultă izopropanol.

Recircularea H_2 şi utilizarea sa ca potenţial reducător păstrează echilibrul redox al mediului de creştere a acestor bacterii.

Fermentaţia butanediolului (2,3 butan-glicol) este produsă de unele enterobacterii (*Vibrio* sp., *Aeromonas* sp.), de unele specii de *Bacillus* şi de unele bacterii lactice (*Streptococcus cremoris, Lactobacillus cremoris*).

Pe lângă sistemul enzimatic al fermentaţiei acide mixte, ele au şi setul de enzime al fermentaţiei particulare, denumită *butanediolică* sau *butilen-glicolică*, care furnizează ca produs final o moleculă neutră de 2,3-butanediol. Această cale metabolică se activează după ce valoarea pH a mediului de creştere scade sub 6.

Reacţia cheie a căii este cea de *condensare* a două molecule de *piruvat*, prin decarboxilare şi eliberare a acidului formic. Rezultă *diacetilul*, care este redus la *acetoină* (acetil-metil-carbinol). Acetoina este redusă şi se formează *butanediolul.*

Diacetilul şi acetoina dau aroma caracteristică untului. Diacetilul se formează din lapte. Citratul este scindat în acetat şi oxalo-acetat. Oxalo-acetatul este decarboxilat la piruvat.

La enterobacterii, butanediolul se formează pe calea acetolactatului.

Acetolactatul este decarboxilat sub acţiunea aceto-lactat-decarboxilazei şi se formează *acetoina*, care este redusă la *butanediol.*

Calea fermentaţiei butanediolice se evidenţiază prin reacţia Voges-Proskauer* şi prin valoarea relativ ridicată a pH.

* Reactia Voges-Proskauer evidenţiază capacitatea unor microorganisme de a produce prin fermentaţia glucozei, acetil-metil-carbinol (acetoina), care în prezenţa alcalilor este oxidat la diacetil. Diacetilul se combină cu arginina, creatina sau cu creatinina din mediu şi determină apariţia culorii roşii.

Fermentaţia acidului propionic

Acidul propionic este produs pe cale fermentativă de un grup de bacterii nesporulate din g. *Propionibacterium*. Ele pot fermenta *acidul lactic* (produsul final al altor fermentaţii bacteriene) (fig. 66). Se formează acid propionic, acid acetic şi CO_2. Această cale de fermentaţie permite generarea ATP prin metabolizarea *acidului lactic sau a acidului piruvic*, rezultat pe calea glicolizei.

2.14.4. Catabolismul lipidelor

Trigliceridele sunt hidrolizate la glicerol si acizi graşi, sub acţiunea exo- sau endolipazelor. Aceste enzime sunt produse de fungi filamentoşi (*A. flavus, P. roqueforti, Rhizopus sp., Geotrichum*), levuri (*Candida lipolytica, Torulopsis, S. cerevisiae*), bacterii (*Serratia liquefaciens, Ps. aeruginosa, Alcaligenes sp., S. aureus*).

Glicerolul intră în calea glicolizei, la nivelul *dihidroxi-aceton-fosfatului*, trecând prin *dihidroxi-acetonă* sau prin *glicerol fosfat*. Ulterior, aceste produse sunt degradate pe *calea glicolizei.* Procesul este anaerob.

Acizii graşi sunt activaţi de ATP în prezenţa CoA şi se formează acil-CoA. Acesta este oxidat la carbonul beta (β-oxidare) şi prin hidroliză rezultă acetil-CoA. AG β-oxidat este mai scurt decât cel iniţial cu doi atomi de carbon.

2.14.5. Catabolizarea compuşilor organici azotaţi

Numeroase bacterii (în special din genurile *Clostridium* şi *Bacillus*) secretă exoproteaze care scindează lanţurile polipeptidice în fragmente de câtiva aminoacizi. Sinteza enzimelor proteolitice este represată dacă în mediu se adaugă hidrolizat de proteine sau amestec de aminoacizi. Peptidazele hidrolizează polipeptidele şi le transformă în aminoacizi. În funcţie de modul de acţiune asupra lanţului polipeptidic, peptidazele sunt de două tipuri: endopeptidaze şi exopeptidaze. La rândul lor, exopeptidazele sunt de două categorii:

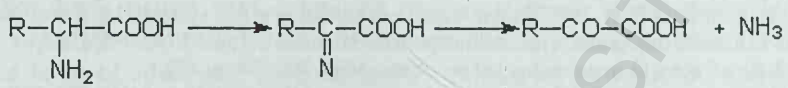
– *aminopeptidaze*, cele care încep acțiunea lor la extremitatea NH_2 liberă a polipeptidului. Activitatea lor depinde de prezența ionilor metalici;
– *carboxipeptidaze*, cele a căror acțiune se inițiază la extremitatea COOH liberă a polipeptidului.

Acțiunea acestor enzime are ca efect formarea di- și tripeptidelor, ulterior hidrolizate în aminoacizi.

Majoritatea bacteriilor oxidează puțin sau deloc aminoacizii. Ele sunt mult mai active în sinteza decât în degradarea lor, în special în faza de creștere rapidă. Unele bacterii pot degrada aminoacizii, în special dacă aceștia sunt unica sursă de C în mediu. La plantele superioare, ca și la bacterii, dominantă este sinteza, deoarece ca și bacteriile, tind să crească continuu.

Aminoacizii sunt catabolizați pe două căi principale:
– *prin dezaminare;*
– *prin decarboxilare.*

Dezaminazele microorganismelor sunt foarte diverse. Ele cuprind enzime oxidative și neoxidative. Rezultatul dezaminării oxidative este formarea *iminoacidului*, care este apoi hidrolizat în acid α- cetonic și NH_3:



Dezaminarea neoxidativă poate fi de trei feluri:
– *dezaminare desaturantă*, cu formarea acidului nesaturat și a NH_3;
– *dezaminare reductivă*, ce constă în reducerea aminoacizilor la acidul saturat corespunzător și formarea NH_3;
– *dezaminare prin deshidratare*, o cale exclusivă a microorganismelor pentru aminoacizii hidroxilați. Se formează acidul cetonic și NH_3;

Un tip special de dezaminare este *dezaminarea cuplată* (reacția Stickland). Reacția se numește dezaminare cuplată, deoarece necesită cel puțin o pereche de aminoacizi complementari, unul fiind oxidat, iar celălalt având rolul de acceptor de electroni.

Aminoacidul donor este oxidat sub acțiunea unei NAD-dehidrogenaze. Rezultatul reacției este dezaminarea celor doi aminoacizi. Acidul alfa-cetonic este decarboxilat secundar, reacție în cursul căreia se produce fosforilarea la nivelul substratului (pentru o pereche de aminoacizi se sintetizează o moleculă de ATP).

Mecanismul reacției Stickland, ca modalitate a metabolismului fermentativ producător de energie. L-alanina are rol de donor de e^-, iar glicina de acceptor. Ambele sunt convertite la acid acetic.

După comportamentul lor în reacția Stickland, aminoacizii se împart în trei grupe: reducători, oxidanți și cei care se comportă ca reducători sau oxidanți, în funcție de condițiile de mediu.

Reacția de dezaminare cuplată este catalizată de numeroase bacterii anaerobe (de exemplu, *Clostridium*).

Decarboxilarea aminoacizilor este o cale de catabolizare comună multor microorganisme, proteolitice sau neproteolitice. Se formează CO_2 și o *amină*.

Un mediu acid favorizează biosinteza decarboxilazelor și pH crește, datorită producerii NH_3, ureii, aminelor, iar într-un mediu alcalin este stimulată sinteza dezaminazelor și valoarea pH scade.

Unele bacterii își obțin energia prin catabolizarea unui singur aminoacid (arginina), pe căi fermentative foarte specifice și complexe sau prin fermentarea unor compuși aminați (purine, pirimidine).

2.14.6. Catabolismul compușilor aromatici

În raport cu capacitatea de a metaboliza compușii aromatici, bacteriile se împart în trei categorii:
– cele care nu degradează astfel de compuși;
– cele care realizează o degradare incompletă (de exemplu, enterobacteriile). *E. coli* scindează *triptofanul* la indol și piruvat, sub acțiunea unei triptofanaze, fără să deschidă

BCUJAI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ciclul benzenic sau pirolic. Reacția de evidențiere a indolului în mediile nutritive peptonate este un test de identificare a enterobacteriilor, utilizat frecvent;

– bacteriile care metabolizează complet compușii aromatici, prin ruperea structurilor ciclice. Reacția de clivare a moleculelor ciclice este generatoare de energie. *E. coli* scindează triptofanul la indol și acid piruvic.

Bibliografie

Schnaitman C. A., Klena J. D. 1993. Genetics of lipopolysccharidae biosynthesis in enteric bacteria. Microbiol. Rev. 57 (3) : 655–682.

Vaara M. 1992. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol. Rev. 565 (3) : 430–481.

Mihăescu G., Ionescu M.D., Mencinicopschi Gh. 1991. Electron-optic studies of protoplasts release from I C A-1.65 line of *Bacillus subtilis* cells. Roum. Arch. Micr. Immun. 50, 1, 27–35.

Magnuson K., Jackowski S., Rock C. O., Cronan J. E. Jr. 1993. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli.* Microbiol. Rev. 57(3): 522–542.

Maloney P. C., Ambudkar S. V., Anatharam V., Sonna L. A., Varadhachary A. 1990. Anion-exchange mechanisms in bacteria. Microbiol. Rev. 54(1): 1–17.

Paulsen I. T., Brown M. H., Skurray R. A. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol. Rev. 60(4): 575–608.

Fath M. J., Kolter R. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. Microbiol. Rev. 57 (4): 995–1017.

Wiggins P. M. 1990. Role of water in some biological processes. Micr. Rev. 54, p. 432.

Krawiec S., Riley M. 1990. Organization of the bacterial chromosome. Microbiol. Rev. 54(4): 502–539.

Matthews K. S. 1992. DNA looping. Microbiol. Rev. 56 (1): 123–136.

Robinow C., Kellenberger E. 1994. The bacterial nucleoid revisited. Microbiol. Rev. 58(2): 162–210.

Laursen B. S., Sorensen H. P., Mortensen K. K., Sperling Peterson H. U. 2005. Initiation of Protein Synthesis in Bacteria. MMBR. 69, 1, pp. 101–123.

Pugsley A. P. 1993. The complete general secretory pathway in Gram negative bacteria – Microbiol. Rev. 57(1): 50–108.

Simonen M., Palva I. 1993. Protein secretion in *Bacillus* species. Microbiol. Rev. 57(1): 109–137.

Michael Dunne Jr. 2002. Type III Secretion System in Bacteria. Clin. Micr. Reviews. 15: 2

Henderson I.R., Garcia F.N., Desvaux M., Fernandez R.C., Ala'Aldeen D. 2004. Type V Secretion Pathway: the Autotransporter Story – MMBR. 68, 4: 692–744.

Ghosh P. 2004. Process of Protein Transport by the Typ III Secretion System. MMBR. 68, 4:771–795.

Coburn B., Sekirov I., Finlay B.B. 2007. Type III Secretion Systems and Disease. Clin. Micr. Reviews. 20, 4: 535–549.

Craig E. A., Gambill B. D., Nelson R. J. 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. Microbiol. Rev. 57(2): 402–414.

Errington J. 1993. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. Microbiol. Rev. 57(1): 1–33.

Brock T. 1988. Biology of microorganisms. Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.

Todar's Online Textbook of Bacteriology, 2004. Kenneth Todar, University of Wisconsin, http://www.textbookofbacteriology.net/

Ross P., Mayer R., Benziman M. 1991. Cellulose biosynthesis and function in bacteria. Microbiol. Rev. 55 (1): 35–58.

Zumft W. G. 1997. Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification. MMBR 61, 4 : 533–616.

Lovely D. R. 1991. Dissimilatory Fe(III) and Mn(IV) reduction. Microbiol. Rev. 55(2): 259–287

Lodish H. Molecular cell biology. 5th Edition

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

3. MICROBIOTA NORMALĂ A ORGANISMULUI UMAN

Microorganismele formează un procent mic, abia semnificativ din greutatea corpului uman (0.8–2 kg de bacterii vii), dar din punct de vedere numeric, bacteriile sunt net superioare (90%) față de celulele proprii (10%), iar numărul de gene în microbiotă este cu două ordine de mărime superior (99%) numărului de gene umane (1%) (Wexler, 2007).

Microbiota normală este reprezentată de populația de microorganisme asociată tegumentului și mucoaselor la indivizii normali (tabelul 1.). Deși organismele animale sunt sterile în cursul vieții intrauterine, imediat după naștere sunt colonizate progresiv de un număr mare de microorganisme, care se găsesc pe suprafața corpului și a diferitelor mucoase, în special pe traiectul digestiv. Numărul microorganismelor la omul adult este apreciat la 10^{14} celule, cu un ordin de mărime peste numărul total al celulelor organismului uman (10^{13}) (Dobzhansky, 1974), cea mai mare parte fiind localizate la nivelul tractului digestiv.

Microorganismele asociate organismului animal și uman pot aparține la două categorii majore:

1) Microbiota *normală* sau *rezidentă* sau *autohtonă* este reprezentată de microorganisme indigene asociate în mod constant cu o anumită zonă corporală, la o anumită vârstă. Asocierea organismelor superioare cu microorganismele a fost stabilită în cursul evoluției comune și sunt reprezentate de bacterii, microfungi și protozoare. Deși de la copiii sănătoși au fost izolate și cultivate mai multe virusuri, Reed și colab. (1974) consideră că în mod normal nu există virusuri asociate.

2) Microorganismele *tranzitorii* sau *străine* sau *alohtone* provin din mediul extern (aer, sol sau de la alte animale) sunt nepatogene sau potențial patogene și populează tegumentul pentru un interval limitat (ore, zile, săptămâni). Acestea nu contribuie semnificativ la activitatea microbiotei normale, la ale cărei condiții nu se pot adapta. Dacă microbiota rezidentă rămâne intactă, microorganismele alohtone nu sunt semnificative, dar dacă echilibrul microbiotei este alterat, cele tranzitorii se multiplică și pot iniția procese infecțioase.

O situație particulară o prezintă microbiota gastrointestinală. Un microorganism poate fi autohton pentru un anumit segment și alohton pentru altul pe care îl tranzitează după ce s-a desprins de habitatul său natural.

S-a calculat că organismul uman adult poartă 10^{12} bacterii pe tegument, 10^{10} în cavitatea bucală, și 10^{14} în tractul gastro-intestinal. Numărul speciilor de microorganisme care populează tegumentul și mucoasele este mult mai mare decât valorile furnizate prin metodele clasice de estimare a diversității bacteriene, deoarece dintre microorganismele care formează microbiota rezidentă și tranzitorie, numai o proporție mică se pot cultiva. Utilizarea tehnicilor moleculare, în special a amplificării ADNr 16S, a făcut posibilă identificarea unui număr mare de specii, în special în secrețiile vaginale.

Grupurile de microorganisme și speciile predominante întâlnite la nivelul diferitelor zone corporale nesterile sunt prezentate în tabelele 1 și 2.

Tabelul 1.

Grupuri de microorganisme întâlnite în microbiota diferitelor cavități la adult (Todar, 2009).

Zona anatomică	Microorganisme dominante în microbiota asociată
Piele	Stafilococi și corinebacterii
Conjunctivă	Coci Gram pozitivi și bacili Gram negativi
Cavitatea bucală	
Smalțul dentar	Streptococci, lactobacilli
Mucoasa cavității bucale	Streptococci și bacterii lactice
Tractul respirator superior	
Vestibul nazal	Stafilococi și corinebacterii
Faringe	Streptococi, neisserii, bacili Gram negativi și coci
Tractul respirator inferior	Steril

Tractul gastrointestinal	
Stomac	*H. pylori* (până la 50% dintre indivizi)
Intestin subțire	Bacterii lactice, coliformi, enterococi, bifidobacterii
Colon	*Bacteroides*, bacterii lactice, coliformi, enterococi, clostridii, bacterii metanogene.
Tractul urogenital	
Uretra anterioară	Stafilococi, corinebacterii, coliformi
Vagin	Bacterii lactice sau microbiotă mixtă

Tabelul 2.

Specii bacteriene predominante în microbiota normală la om (Todar, 2009).

SPECIA BACTERIANĂ	Piele	Conjunctivă	Vestibul nazal	Faringe	Cavitatea bucală	Intestin subțire	Uretra anterioară	Vagin
S. epidermidis	++	+	++	++	++	+	++	++
*S. aureus**	+	+/-	+	+	+	++	+/-	+
Str. mitis				+	++	+/-	+	+
Str. salivarius				++	++			
*Str. mutans**				+	++			
*Enterococcus faecalis**				+/-	+	++	+	+
*Str. pneumoniae**		+/-	+/-	+	+			+/-
*Str.pyogenes**	+/-	+/-		+	+	+/-		+/-
Neisseria sp.		+	+	++	+		+	+
*N. meningitidis**			+	++	+			+
*Enterobacteriaceae** *(E. coli)*		+/-	+/-	+/-	+	++	+	+
Proteus sp.		+/-	+	+	+	+	+	+
*Ps. aeruginosa**				+/-	+/-	+	+/-	
*H. influenzae**		+/-	+	+	+			
*Bacteroides sp.**						++	+	+/-
Bifidobacterium bifidum						++		
Lactobacillus sp.				+	++	++		++
*Clostridium sp.**					+/-	++		
Cl. tetani						+/-		
Corynebacterii	++	+	++	+	+	+	+	+
Mycobacterii	+		+/-	+/-		+	+	
Actinomicete				+	+			
Spirochete				+	++	++		
Micoplasme				+	+	+	+/-	+

++ = 100 %; + = 25 %; +/- = rare (5%); * = potențial patogene

3.1. Colonizarea şi succesiunea microorganismelor la organismul uman

Colonizarea microbiană a tuturor suprafețelor externe şi a unora interne ale organismului începe la naştere.

Fătul este steril *in utero*, dar se infectează în cursul trecerii prin vagin şi genitalele externe materne şi de la orice sursă din mediu, la care este expus.

În cursul procesului de colonizare, multe microorganisme contaminante mor şi dispar, deoarece nu se pot adapta. Totdeauna însă există unele specii-pionier care se stabilizează, aderă la diferite substraturi sau se divid cu o rată superioară celei a eliminării. La sugarul hrănit natural, primele bacterii care apar în sistemul digestiv aparțin genului *Lactobacillus*, urmat după 1–2 zile de *Bifidobacterium*, care devine predominant numeric. Ulterior se instalează alte specii facultativ anaerobe (*E. coli, S. faecalis*).

Modificarea majoră a microbiotei la toate animalele studiate este asociată cu tranziția la alimente solide, când apar bacterii strict anaerobe (*Bacteroides sp.*), în special în intestinul gros, iar numărul celor facultativ anaerobe scade progresiv.

Mecanismele colonizării sunt parțial cunoscute. Colonizarea trebuie să învingă sistemele de eliminare mucociliare (care îndepărtează bacteriile nelegate de epitelii), fluxul unidirecțional al lichidelor pe suprafața epiteliilor şi activitatea peristaltică (a tubului digestiv), rata de *turnover* a celulelor epiteliale senescente, sistemele imunitare locale (producerea de sIgA, producerea de lizozim, sinteza de analogi ai

BCU CLUJ / CENTRALA UNIVERSITARĂ / LIBRARY

receptorilor specifici, care se combină cu suprafețele de legare bacteriană, neutralizându-le capacitatea de aderență) (fig. 25), variațiile pH şi ale potențialului redox, efectul antibacterian al bilei neconjugate, care explică numărul mic al bacteriilor din intestinul subțire, producerea de către gazdă, a unor proteine care leagă Fe, creând un deficit de Fe pentru bacterii, competiția cu alte microorganisme etc.

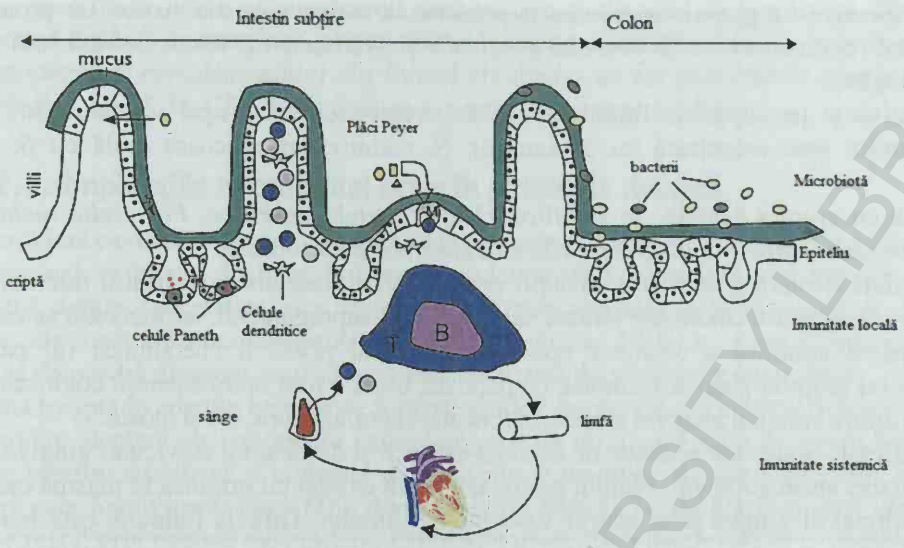


Fig. 25. Ilustrarea mecanismelor de apărare de la nivelul intestinului (după Orhage şi Nord, 2000).

S-a semnalat existența unei anumite asemănări antigenice între suprafața celulei microbiene şi mucusul sau mucoasa intestinală, în care ocupă un habitat.

Aderența are un caracter de specificitate, în sensul că epiteliile situate în diferite localizări anatomice leagă specii bacteriene diferite.

Aderența bacteriană este, de regulă, funcția adezinelor bacteriene, care se leagă de receptorii glicoproteici sau glicolipidici complementari de pe suprafața celulelor epiteliale ale gazdei.

3.2. Microbiota normală a tractului respirator şi a cavității orale

Ecosistemul oral format din microorganisme şi totalitatea suprafețelor pe care pot să adere, este influențat de 3 categorii de factori: ai gazdei, ai microorganismelor şi externi.

Mucoasa orală şi faringiană sunt sterile la naştere. La 4–12 ore după naştere, colonizarea cavității orale a nou născutului începe cu streptococi din grupul *viridans* (*S. mitis, S. oralis* şi *S. salivarius*). Streptococii, probabil de origine maternă, devin dominanți şi rămân astfel pentru toată viața. Ulterior, microorganismele se diversifică. Succesiunea se încheie când toate suprafețele au fost populate.

Curând după aceea, mucoasele sunt populate cu stafilococi, diplococi Gram negativi (*Neisseria* sp.,), difteroizi şi lactobacili.

Pe mucoasa căilor respiratorii superioare (nări şi nazofaringe), numărul microorganismelor este mic, fiind reprezentate de coci Gram pozitivi (*S. aureus* şi specii coagulazo-negative, *Peptostreptococcus sp., Stomatococcus mucilaginosus, Gemella* sp.), *Corynebacterium sp., Fusobacterium sp.* Dintre cocii Gram negativi anaerobi cei mai frecvenți sunt speciile de *Veillonella sp.*

Prezența tranzitorie a unor microorganisme patogene (de exemplu, *S. pyogenes* care produce faringita streptococică) este frecvent întâlnită.

În nazofaringe, populația de microorganisme este mai complexă: predomină speciile de *Streptococcus* şi *Neisseria* (streptococii α-hemolitici şi 12 specii de *Neisseria*). Colonizarea cu *N. meningitidis* atinge valori mari (până la 95%) la adulții tineri din aglomerările umane.

În căile respiratorii medii (orofaringe şi tonsile) predomină cocii Gram pozitivi şi cei Gram negativi. Bacilii Gram pozitivi din microbiota orofaringelui sunt speciile de *Actinomyces sp., Actinobacillus sp., Corynebacterium sp., Lactobacillus sp., Propionibacterium sp.. Actinobacillus actinomycetemcomitans* este cauza periodontitei juvenile.

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bacilii Gram negativi anaerobi din orofaringe sunt *Fusobacterium sp., Bacteroides sp., Porphyromonas sp., Prevotella sp., Selenomonas sp., Haemophilus influenzae, H. parainfluenzae.* Cei anaerobi depăşesc pe cei aerobi în proporţie de 100/1. Căile respiratorii inferioare (laringe, trahee, bronhii şi plamâni) sunt sterile.

C. albicans (din grupul fungilor) este prezentă la majoritatea indivizilor, iar protozoarele din orofaringe sunt reprezentate de *Entamoeba gingivalis* şi *Trichomonas tenax,* nefiind însă implicate în procese patologice.

În salivă şi pe suprafaţa limbii se găsesc streptococi din grupul viridans *(Str. salivarius).* Suprafaţa dinţilor este colonizată cu *S. sanguis, S. mutans*, iar mucoasa orală cu *S. vestibularis* şi *S. sanguis.*

Odată cu erupţia dentară, se stabilizează spirochetele anaerobe, *Prevotella melaninogenica, Fusobacterium* sp., *Capnocytophaga* sp., vibrioni anaerobi şi lactobacili.

Suprafaţa dentară şi mucoasa cavităţii orale sunt habitate distincte pentru microbiota cavităţii orale. Dintele oferă pentru colonizare situsul subgingival şi supragingival, iar mucoasa se caracterizează prin descuamarea continuă a celulelor epiteliale. Epiteliul poate fi cheratinizat (al palatului) sau necheratinizat (al şanţului gingival). Limba, cu papilele, oferă o nişă optimă pentru colonizare, iar şanţul gingival (aria dintre epiteliul gingival şi dinte) oferă atât suprafaţă dură, cât şi moale.

Suprafeţele orale sunt scăldate de secreţia salivară şi de lichidul crevicular gingival, care oferă nutrienţi şi factori antimicrobieni. Fluidul gingival este un exudat cu originea în plasmă care trece prin epiteliul joncţional al gingiei şi se scurge de-a lungul dintelui. Difuzia fluidului este lentă în gingia sănătoasă, dar rata creşte în gingia inflamată. Compoziţia fluidului este asemănătoare cu aceea a plasmei: conţine proteine serice, albumină, leucocite, imunoglobuline, complement.

Mediul supragingival al cavităţii orale este controlat în primul rând de secreţia salivară. Saliva conţine factori de apărare nespecifică: sIgA (Ig A din secreţii), mucine, glicoproteine, lactoferină, lizozim, peroxidază, histatine, cistatine.

sIgA reprezintă izotipul dominant al imunoglobulinelor în secreţia salivară şi are un rol major în reacţiile de apărare, fiind prima linie de apărare faţă de agenţii patogeni care tind să colonizeze sau să invadeze suprafeţele organismului gazdă. sIgA reacţionează cu diferite antigene ale microbiotei salivare. Totuşi, bacteriile indigene supravieţuiesc în cavitatea orală, deoarece sunt mai puţin sensibile sau evită mecanismele imunitare.

Mucinele, principalul component organic al secreţiilor mucoase, sunt glicoproteine cu greutate moleculară mare produse de glandele salivare submandibulare, sublinguale şi de numeroasele glande salivare mici. Ele au rol protector pentru suprafeţele dure şi moi.

Mucinele şi glicoproteinele adsorbite pe suprafaţa dintelui favorizează aderenţa bacteriană, iar când sunt libere în salivă se pot lega cu adezinele bacteriene sau produc chiar aglutinarea bacteriilor.

Lizozimul este o proteină cationică mică prezentă în toate fluidele corpului, secretată de celulele ductale intercalate. Acţiunea sa constă în hidroliza legăturilor glicozidice ale peptidoglicanului parietal.

Lactoferina este o glicoproteină care leagă Fe, produsă de celulele ductale intercalate. Inhibă creşterea microbiană, probabil prin sechestrarea Fe în mediu.

Peroxidaza salivară, secretată de celulele acinare ale glandelor salivare, este o componentă a sistemului antimicrobian care implică oxidarea tiocianatului salivar la hipotiocianat şi a H_2O_2 de origine bacteriană şi diminuează producerea acidului în placa dentară.

Histatinele (peptide bogate în His) sunt o familie de peptide bazice mici produse de celulele acinare. Inhibă dezvoltarea *C. albicans* la forma infecţioasă.

Cistatinele (fosfoproteine bogate în Cys) sunt secretate de celulele acinare. Se găsesc şi în plasmă şi pot ajunge în cavitatea orală pe calea fluidului crevicular. Cistatinele acţionează ca inhibitori ai tiol-proteazelor şi inhibă proteazele produse de bacteriile plăcii dentare.

Şanţul gingival rămâne controlat numai de fluidul crevicular şi de componentele sale, deoarece saliva nu are acces. Componentele celulare şi humorale ale sângelui pot ajunge în şanţul gingival prin trecerea, la nivelul epiteliului gingival, în fluidul gingival. Curgerea fluidului se amplifică mult în starea patologică a gingiei.

Lichidul gingival conține IgM, IgA, complement, leucocite, cu acțiune protectoare față de invazia microbiană.

Leucocitele fluidului gingival sunt reprezentate de polimorfonucleare (90%), restul fiind mononucleare. Majoritatea mononuclearelor (60%) sunt limfocite B, 20–30% sunt limfocite T și 10–15% sunt macrofage. Polimorfonuclearele sunt viabile și capabile de fagocitoză. Probabil rămân viabile la o mică distanță de marginea gingiei, dar se lizează osmotic imediat ce ajung în salivă.

Componentele *complementului* din fluidul crevicular au rol protector în gingia sănătoasă. În inflamația gingiei, apar C3a, C3b, C5a, ceea ce sugerează activarea cascadei.

3.2.1. Implicațiile microbiotei orale în patologia dentară

Microbiota cavității orale este asociată cu două maladii orale: *formarea cariilor* și *periodontita.*

Caria este rezultatul dezintegrării țesutului dentar de la suprafață spre interior. Într-o primă etapă, smaltul dentar (necelular) este demineralizat sub acțiunea acizilor rezultați din procesele fermentative ale bacteriilor componente ale plăcii dentare. Ulterior, descompunerea dentinei și cementului se datorează digestiei matricei proteice catalizată de proteazele bacteriene.

Prima treaptă în apariția cariei este formarea *plăcii bacteriene* pe smaltul dentar.

Suprafața dentară este un mediu natural populat de un număr mare de specii bacteriene, care formează un biofilm stratificat și compact denumit *placă dentară.* Numărul speciilor bacteriene din placa dentară este foarte mare: circa 60% dintre speciile bacteriene ale plăcii au fost identificate prin *cultivare*, iar restul prin metode *moleculare.* Estimările diversității bacteriene în cavitatea orală, bazate pe metodele clasice de cultivare, indică existența a peste 500 de specii (509 specii izolate din plăcile a 300 de pacienți). Metodele moderne de biologie moleculară (PCR) au permis identificarea multor specii necultivabile.

Majoritatea microorganismelor (MO) persistă în mediile naturale, nu ca organisme libere, ci atașate de suprafețe, într-o *peliculă* (*biofilm*), care formează un ecosistem prin diversitatea componentelor celulare și complexitatea proceselor metabolice.

Bacteriile se asociază și se atașează succesiv la bacteriile biofilmului timpuriu, datorită unui proces de recunoaștere între specii distincte genetic, denumit *coagregare.* Bacteriile diferite genetic pot să adere prin intermediul adezinelor. Adezinele recunosc receptori proteici, glicoproteici sau polizaharidici existenți pe suprafețele orale și pe alte tipuri de celule bacteriene.

Placa dentară, ca orice biofilm, este alcătuită din celule și matrice (fig. 26). Matricea constă dintr-un amestec de polizaharide (PZ) extracelulare cu greutate moleculară mare, glicoproteine salivare, acizi nucleici, ioni de Ca și P. Cele mai multe bacterii produc PZ, fie sub forma unei capsule, fie a unui glicocalix.

Formarea plăcii dentare. Aproape imediat după periajul dentar, pe suprafețele expuse ale smaltului dentar se formează o *peliculă proteică* formată din albumină, lizozim, glicoproteine, lipide, fosfoproteine, fluidul sulcului gingival. Într-un interval de ordinul orelor după formarea peliculei, coci și bacili Gram pozitivi din microbiota normală orală colonizează aceste suprafețe: *Str. mutans, Str. salivarius*, actinomicete și mai puțin *Haemophilus sp.*. Colonizatorii inițiali ai plăcii sunt streptococii, dar în câteva zile comunitatea este dominată de *Actinomyces sp.*. Streptococii reprezintă 60-90% dintre bacteriile care colonizează smaltul dentar în primele 4 ore după periaj. Streptococii produc glucani extracelulari, prin intermediul cărora aderă la pelicula proteică dentară. Bacteriile colonizatoare primare coagregă numai cu un set de colonizatori timpurii (*Actinomyces sp., Capnocytophaga sp., Eikenella sp., Haemophillus sp., Prevotella sp., Propionibacterium sp., Veillonella*) și în general nu coagregă cu colonizatorii tardivi (*Treponema denticola, Porphyromonas gingivalis*). După câteva zile, predomină actinomicetele producătoare de proteaze și începe să se dezvolte matricea caracteristică a biofilmului. Puntea de legătură între cele două categorii de colonizatori este *F. nucleatum*, ceea ce explică abundența sa numerică în probele normale și patologice. Odată cu scăderea potențialului redox al plăcii devin dominante speciile microaerofile și moderat anaerobe. Speciile microaerofile din constituția plăcii dentare sunt reprezentate de: *A. actinomycetemcomitans, Campylobacter rectus, Eikenella corrodens,* iar speciile anaerobe de: *P. gingivalis, B. forsythus, T. denticola, P. intermedia, F. nucleatum, Eubacterium* sp.

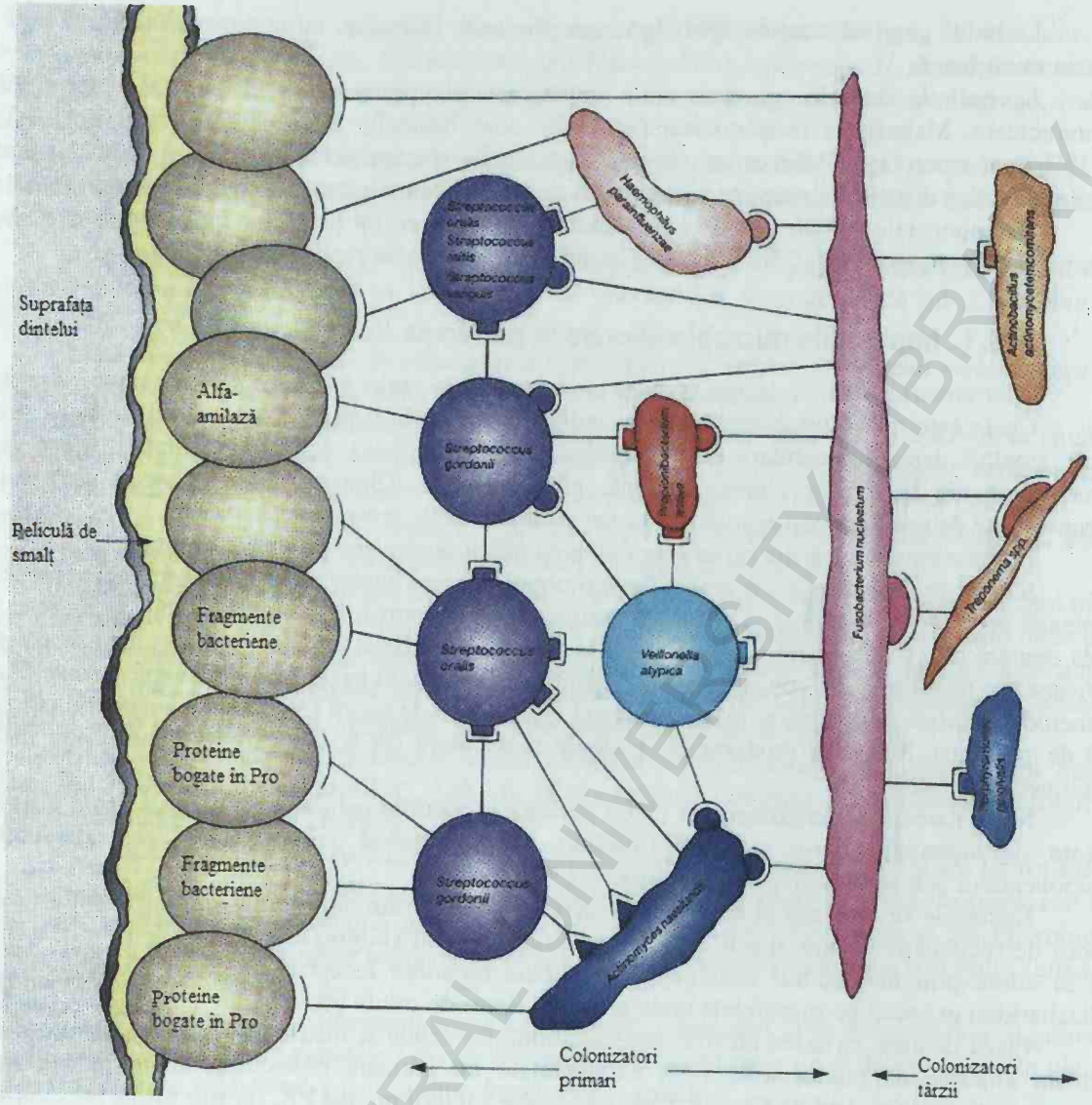


Fig. 26. Etapele colonizării smalțului dentar cu microorganisme și formării plăcii dentare (după Blatner, 2009).

Activitățile metabolice în interiorul plăcii sunt foarte complexe și adeseori complementare. De exemplu, *F. nucleatum* nu produce proteaze, dar *Porphyromonas gingivalis*, cu care coexistă, este foarte proteolitic.

În absența măsurilor de igienă orală, placa dentară se dezvoltă în 2–3 săptămâni, cu o grosime de 50–100 μm, pe suprafața dentară dar și în ariile protejate, inclusiv între dinți și în sulcul gingival (între rădăcina dintelui și epiteliul gingiei).

În interiorul plăcii dentare, celulele bacteriene sunt protejate, pentru că difuzia substanțelor antimicrobiene este foarte limitată, iar lizozimul salivar pătrunde tot mai greu.

Nutrienții pentru bacteriile plăcii pot avea origine salivară, alimentară sau sunt aduși de fluidul șanțului subgingival, un exudat seric ce scaldă șanțul gingival.

Datorită colonizării cu microorganisme, suprafața dentară devine anaerobă. Potențialul redox scade de la peste + 200 mv, la –30 mv în cursul primelor două zile de colonizare și ajunge la –150 mv după 7 zile. Proporția microorganismelor anaerobe crește odată cu vârsta biofilmului.

Saliva are rol în menținerea unui pH în jurul valorii neutre (6,7–7,3) prin două mecanisme: elimină glucidele și acizii rezultați din fermentație și are activitate de tampon a aciditătii (alimentare și bacteriene) prin bicarbonat. Treptat, datorită difuziei tot mai lente a salivei în placă, acizii produși se acumulează în interiorul plăcii și pH scade la valori acide.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În raport cu poziția față de marginea gingiei, se disting 2 tipuri de placă: *supragingivală* și *subgingivală.*

Placa supragingivală este dominată de bacterii din genurile *Streptococcus* și *Actinomycetes*, iar cea subgingivală este alcătuită din microbiota anaerobă Gram negativă, dominată de spirochete necultivabile.

Caria dentară este o maladie a țesutului dur al dintelui, caracterizată prin *dezintegrarea localizată, progresivă a structurii dentare.* Formarea cariei se datorează prezenței plăcii bacteriene pe suprafața coroanei dentare. Demineralizarea dintelui (smalț, dentină și cement) este consecința acțiunii acizilor organici produși de bacterii prin fermentarea glucidelor alimentare. Ingestia frecventă a glucidelor poate duce la selecția bacteriilor acidogene și acidurice (capabile să tolereze acidul), cu scăderea pH la 5-5,5, valoarea critică pentru demineralizare.

Placa bacteriană este o comunitate complexă și de aceea este greu de identificat agentul bacterian cariogen. Există dovezi că *S. mutans* și *Lactobacillus* sp. sunt implicate în inițierea și progresia cariei. Ambele fermentează rapid glucidele, cu producere de acizi, în special acid lactic și tolerează pH acid (fig. 27).

Periodontita. Pe măsură ce se dezvoltă în șanțul subgingival, bacteriile produc enzime proteolitice ce lizează direct țesutul sau interferă cu factorii apărării locale. Colagenaza și hialuronidaza degradează colagenul. Degradarea barierei fibrelor este urmată de lezarea structurilor de suport dentar.

Bacteriile Gram negative ale plăcii, după ce se lizează, eliberează endotoxină, care stimulează *inflamația.*

P. gingivalis, in vitro, poate invada celulele epiteliului gingival și are mecanisme invazive asemănătoare altor bacterii patogene invazive.

Periodontita este un proces inflamator al țesutului de sprijin al dintelui, prin care acesta se atașează la osul alveolar, ca răspuns la acumularea bacteriană pe suprafața dentară. Leziunile de periodontită se manifestă printr-un proces inflamator mediu și reversibil al gingiilor, până la distrugerea țesutului periodontal (gingie, ligament periodontal și a osului alveolar). Periodontita cronică poate duce la pierderea osului și migrarea apicală a epiteliului joncțional, cu formarea pungilor periodontale.

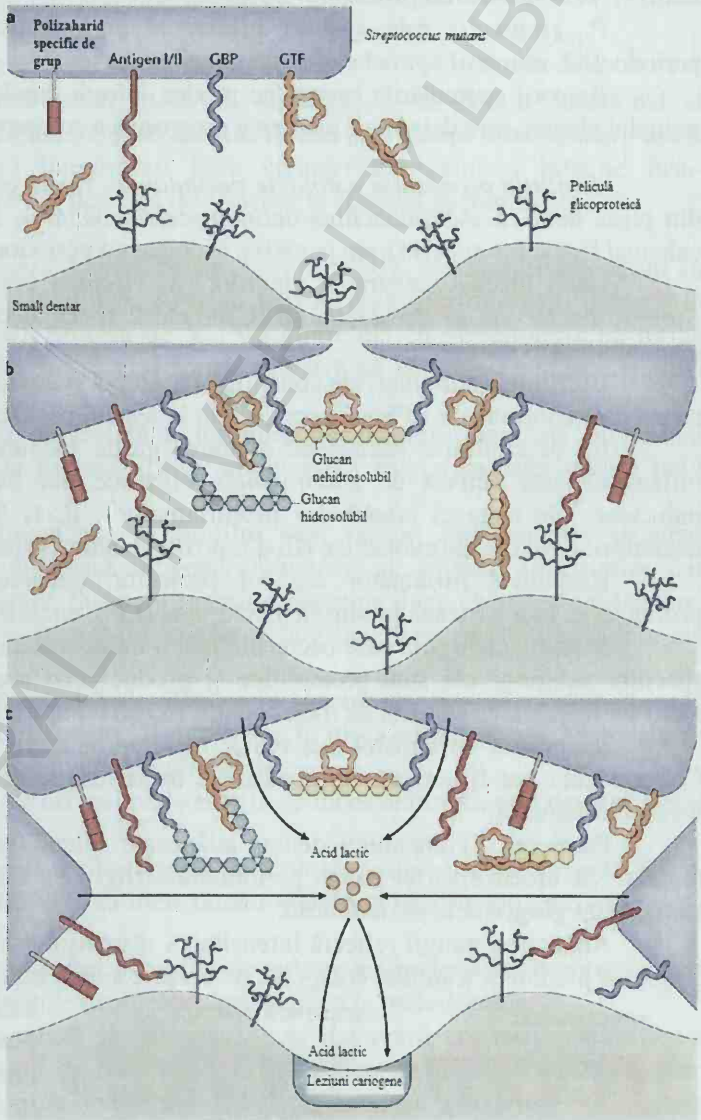


Fig. 27. Implicațiile metabolismului bacterian (*Str. mutans*) în geneza leziunilor cariogene (după Taubman și Nash, 2006). *Str. mutans* aderă la pelicula glicoproteică formată pe smalțul dentar prin intermediul mai multor tipuri de adezine (glucidele specifice de grup, adezina spteptococică sau Antigenul I/II, GTF (glucozil transferaze, enzime exprimate constitutiv de *Str. mutans*) si GBP (*glucan binding proteins*) (proteine care leagă glucanul). În prezența zaharozei, GTF sintetizează glucani extracelulari din glucoza rezultată alături de fructoză din scindarea zaharozei. *Str. mutans* aderă la acești glucani prin intermediul GTF și GBP, rezultând agregate bacteriene care prin metabolizarea glucidelor produc cantități mari de acid lactic, ce determină demineralizarea smalțului dentar, și în consecință, caria dentară.

BUCUREȘTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Canalul dintre rădăcina dintelui şi suprafaţa epiteliului gingiei se numeşte *şanţ subgingival* şi este situsul primar al infecţiei periodontale. Odată cu progresia maladiei, şanţul se va adânci într-o *pungă periodontală,* care se poate extinde pe 4–12 mm şi poate să conţină o populaţie bacteriană de 10^7–10^9 celule.

De la pacienţii cu maladie periodontală moderată s-au izolat: *Fusobacterium nucleatum, Peptostreptococcus micros, Eubacterium timidum, Lactobacillus sp, Actinomyces naeslundii, Ps. anaerobius, Eubacterium sp., Bacteroides intermedius, Fusobacterium sp., Selenomonas sputigena, Haemophilus aphrophilus*. Bacteriile rareori invadează ţesuturile, dar eliberează substanţe care pătrund în gingie şi produc *distrugerea directă a ţesutului sub acţiunea enzimelor şi endotoxinelor* sau *indirect, prin inducerea procesului inflamator.*

P. gingivalis este agentul primar al periodontitei. În placa gingivală a pacienţilor cu periodontită, numărul spirochetelor şi al cocilor are tendinţa de creştere.

Rareori, acumulările bacteriene produc infecţii deschise, dar stimulează răspunsul inflamator al ţesutului gingiei, care determină pierderea progresivă a colagenului ce ancorează dintele de osul alveolar.

Evoluţia procesului patologic periodontal. Boala periodontală (BP) este produsă de bacteriile din placa dentară. *Actinobacillus actinomycetemcomitans, P. gingivalis, Bacteroides forsythum* sunt cele mai frecvente specii Gram negative asociate cu periodontita.

Când începe sângerarea gingiilor, *A. viscosus* are o pondere importantă şi deja au apărut *Campylobacter* sp. şi *Prevotella* sp. Ultimele 2 specii necesită factori nutritivi ai gazdei (hemina), disponibili prin sângerare.

Biofilmele subgingivale constituie o enormă şi continuă încărcătură bacteriană. Ele sunt rezervoare continue de LPS, cu acces direct la ţesutul periodontal şi fluxul sanguin.

La acumulările bacteriene dentare, gazda răspunde prin *reacţie inflamatorie.* Răspunsul inflamator este activat de *endotoxinele* eliberate din bacteriile Gram negative, cele mai bune inductoare ale sintezei *citokinelor* proinflamatorii: IL-1, IL-6 şi TNF. Acestea induc sinteza altor mediatori: citokine chimiotactice (IL-8), prostaglandine şi leucotriene.

Răspunsul inflamator are rol protector, deoarece împiedică diseminarea bacteriilor în profunzime, îndepărtează produsele bacteriene (LPS, enzime) şi se sintetizează anticorpi.

Mecanismele prin care bacteriile plăcii induc reacţia inflamatorie sunt nespecifice. Majoritatea speciilor subgingivale sunt proteolitice şi produc acizi graşi (butirat, propionat, izobutirat), H_2S şi metil-mercaptan, ca produşi de metabolism. Aceşti compuşi sunt citotoxici pentru ţesutul gingival.

Răspunsul inflamator activează metaloproteazele matriceale, care hidrolizează colagenul. Colagenazele pot fi activate de proteazele bacteriene şi de intermediarii reducerii parţiale a O_2 din focarul inflamator.

Pierderea ligamentului dentar adânceşte sulcul (şanţul) dintre ţesutul gingival şi rădăcina dintelui. Se creează astfel punga periodontală (fig. 28). Pierderea parţială a ligamentului de ataşare converteşte gingivita la *periodontită.*

Adâncirea pungii reflectă intensitatea răspunsului inflamator, care cauzează edemul ţesutului gingiei şi pierderea ţesutului colagenic de ataşare a dintelui la osul alveolar. Cu cât este mai adâncă, cu atât punga este mai inaccesibilă igienei orale. Numărul bacteriilor rămâne relativ constant: creşterea lentă este echilibrată de desprinderile de la suprafaţa plăcii, odată cu fluidul sulcului gingival. În gingia inflamată, fluxul sanguin este stimulat, creşte numărul de neutrofile în fluidul sulcului gingival şi de mononucleare în epiteliu, creşte nivelul IgG şi IgA faţă de antigenele bacteriene, creşte rata de turnover a epiteliului gingival. Vascularizaţia abundentă a ţesutului gingival este un mecanism de apărare, deoarece este o barieră oxidativă faţă de microbiota anaerobă a plăcii.

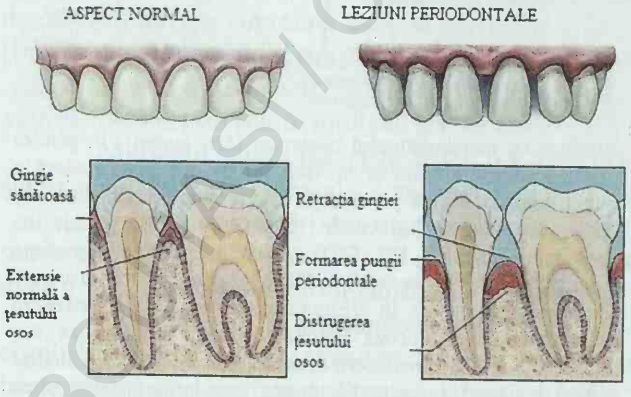


Fig. 28. Reprezentarea schematică a proceselor patologice periodontale (după Curtis, 2009).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Factorii care determină constricția arteriolelor periferice, ca fumatul şi stressul, sunt factori de risc pentru BP, deoarece reducerea fluxului sanguin permite o mai bună supraviețuire a bacteriilor anaerobe, iar produsele lor activează colagenazele interstițiale. Fumatul este un factor major de risc pentru periodontită şi este asociat cu prevalența crescută a lui *B. forsythus* şi *P. gingivalis*.

Mecanismele de apărare sunt favorabile gazdei, singurul aspect defavorabil fiind pierderea lentă a țesutului colagenic de ancorare a dintelui. La un număr mic de pacienți, deteriorarea este foarte rapidă, la o vârstă timpurie şi este favorizată de factori genetici predispozanți: neutrofilele şi/sau monocitele au disfuncții chimiotactice.

Una dintre clasificările bolii periodontale identifică următoarele forme:

- *gingivita,* fără pierderea țesutului de ancorare dentară;
- *periodontita adultului;*
- *periodontita timpurie* (la pacienți între 14–35 de ani);
- *gingivita ulcerativă necrozantă acută (ANUG)*, asociată cu un deficit funcțional al neutrofilelor. Apare la persoane tinere şi se caracterizează prin atacul brusc, durere acută şi necroza țesutului (papilei) interdentar. Este caracterizată printr-o infecție fuso-spirochetală (*Treponema vincenti*), descrisă de Vincent la sfârşitul secolului 19.

Controlul plăcii. Prevalența bolii periodontale creşte cu vârsta: 50% dintre indivizii adulți au gingivită (inflamația gingiei fără pierderea dinților); 30% au periodontită (definită prin prezența a 3–4 dinți cu pungi de cel puțin 4 mm). Un procent de 5–15% dintre cei cu periodontită au formă avansată cu pungi de cel puțin 6 mm. Alți 3–4% au o formă agresivă de BP, denumită periodontită timpurie, care se manifestă între 14–35 de ani.

Sângerarea gingivală şi pierderea progresivă a țesutului de ancorare, asociate procesului inflamator sunt nedureroase şi ignorate de pacient. Lipsa simptomelor este o caracteristică a bolii periodontale.

Infecțiile cu microorganismele organizate în biofilm sunt rareori eradicate de sistemul imunitar al gazdei. Bacteriile din biofilm eliberează antigene, inductoare ale sintezei anticorpilor, dar sunt rezistente la aceste mecanisme de apărare. Sistemul imunitar poate produce chiar leziuni tisulare. De aceea, tratamentul infecțiilor cu microorganisme organizate în biofilme necesită abordarea unor noi strategii.

În majoritatea cazurilor simptomele clinice ale plăcii sunt asociate cu creşterea preponderentă a câtorva specii anaerobe: *P. gingivalis, B. forsythus, T. denticola*, în placa subgingivală. Metodele de tratament se bazează pe ideea că boala periodontală este o infecție.

Bacteriile din placă pot fi de 1000 de ori mai rezistente la acțiunea antibioticelor decât aceleaşi organisme libere în suspensie.

Terapia cu antibiotice sau cu agenți antibacterieni de sinteză poate elimina formele libere, planctonice, dar celulele aderate de suportul viu sau inert rămân viabile în biofilm şi după terminarea terapiei continuă să se dividă.

Orice condiție care diminuează eficiența mecanismelor de apărare antibacteriană (imunodeficiență primară sau secundară, diabetul, disfuncții ale neutrofilelor), predispune la periodontită.

Tratamentul tradițional la BP sugerează că periodontita se datorează creşterii nespecifice a bacteriilor pe suprafața dentară şi că gradul de dezvoltare a plăcii dentare poate fi controlat prin curățire periodică. Dacă acumulările nu sunt îndepărtate, diferite produse bacteriene (LPS, alte antigene, enzime) stimulează răspunsul inflamator al gingiei. Placa se calcifică şi formează *calcul dentar* (tartru), sub marginea gingiei. În pungile mai mari de 5 mm, îndepărtarea plăcii necesită o cale chirurgicală de acces. După îndepărtarea plăcii, gradul inflamației diminuă. Curățirea dentară se recomandă la fiecare 3–6 luni.

Tratamentul clasic, bazat pe ipoteza plăcii nespecifice se face prin metode care au în vedere stadiul de evoluție a procesului inflamator: *gingivita* se tratează prin îndepărtarea mecanică a plăcii, iar *periodontita*, cu agenți antimicrobieni cu spectru larg (*tetraciclina*) sau cu o combinație de agenți ca *amoxicilina* şi *metronidazolul*. S-au utilizat de asemenea, penicilina V, ampicilina, augmentinul, eritromicina, cefalexina. Este imposibilă însă găsirea unui antibiotic care să inhibe creşterea celor peste 500 de specii care cresc pe suprafața dentară.

Clătirea cu *clorhexidină* după curățirea mecanică ameliorează semnificativ starea gingiilor.

ANUG se poate controla prin spălări cu agenți oxidanți (iod, H_2O_2) sau cu penicilină administrată sistemic.

Factorii de risc pentru periodontită sunt în același timp, factori de risc pentru maladii sistemice, cum sunt boala cardiovasculară: fumatul, stresul, îmbătrânirea, rasa, sexul masculin.

3.3. Habitatele microbiotei gastrointestinale

Ecosistemul gastrointestinal este complex, deschis, integrat şi format din cele mai multe habitate pentru microorganisme, fiecare fiind colonizat de mai multe specii de microorganisme autohtone (tabelul 3, fig. 29).

Tabel 3.

Compoziția microbiotei orofaringiene şi gastro-intestinale (după Orhage şi Nord, 2000).

Microorganisme	Număr de microorganisme (UFC/ml sau UFC/g)				
	orofaringe	stomac	jejun	ileon	colon
Număr total	10^8 - 10^{10}	0 - 10^4	0 - 10^5	10^4 - 10^8	10^{10} - 10^{12}
Microorganisme aerobe					
Streptococcus	10^6 - 10^8	0 - 10^3	0 - 10^4	10^2 - 10^4	10^3 - 10^5
Enterococcus	rare	rare	0 - 10^2	10^2 - 10^4	10^5 - 10^{10}
Staphylococcus	0 - 10^2	0 - 10^2	0 - 10^3	10^2 - 10^5	10^4 - 10^6
Enterobacteria	rare	0 - 10^2	0 - 10^3	10^2 - 10^7	10^4 - 10^{10}
Fungi	0 - 10^3	0 - 10^2	0 - 10^2	10^2 - 10^4	10^2 - 10^5
Bacterii anaerobe					
Peptostreptococcus	10^4 - 10^6	0 - 10^3	0 - 10^3	10^2 - 10^6	10^{10} - 10^{12}
Bifidobacterium	0 - 10^2	0 - 10^2	0 - 10^4	10^3 - 10^9	10^8 - 10^{11}
Lactobacillus	0 - 10^3	0 - 10^3	0 - 10^4	10^2 - 10^5	10^6 - 10^8
Clostridium	rare	rare	rare	10^2 - 10^4	10^6 - 10^9
Eubacterium	10^2 - 10^3	rare	rare	rare	10^9 - 10^{12}
Veillonella	10^3 - 10^8	0 - 10^2	0 - 10^3	10^2 - 10^4	10^3 - 10^6
Fusobacterium	10^4 - 10^8	0 - 10^2	0 - 10^3	10^3 - 10^4	10^6 - 10^8
Bacteroides fragilis	rare	rare	0 - 10^3	10^3 - 10^7	10^{10} - 10^{12}
Prevotella	10^6 - 10^8	0 - 10^2	10^2 - 10^4	10^3 - 10^4	10^4 - 10^5

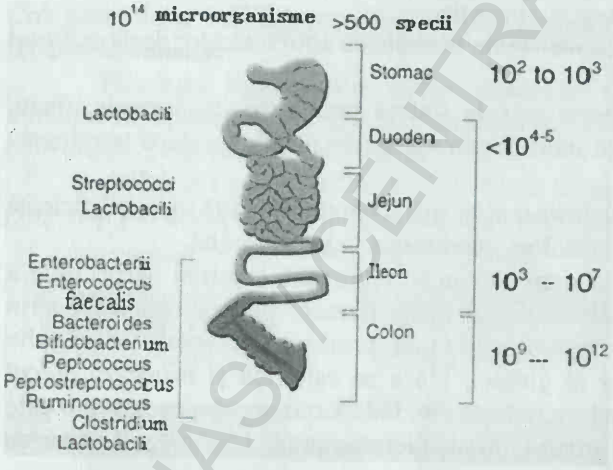


Fig. 29. Speciile predominante ale microbiotei în diferite etaje ale tractului gastro-intestinal (după Orhage şi Nord, 2000).

Acestea pot avea trei localizări:

1) lumenul are calitatea de habitat în măsura în care microorganismele pot coloniza materialele prezente în el. Habitatul adevărat este reprezentat de suprafața particulelor de materiale solide, cum ar fi cele ale constituenților alimentari;

2) suprafața epitelială a diferitelor regiuni ale tubului digestiv;

3) criptele mucoaselor, prezente mai ales în intestinul subțire superior, cecum şi colonul anumitor animale.

Microbiota gastrică. Stomacul este un compartiment ostil dezvoltării microorganismelor şi de aceea este considerat steril, dar poate conține microorganisme ingerate odată cu alimentele sau cu apa. Acest fenomen este foarte accentuat la animalele coprofage (rozătoare, porc etc.) care ingeră cantități imense de microorganisme alohtone provenite din fecale.

Odată ajunse în stomac, marea majoritate a microorganismelor sunt distruse de aciditatea secreției gastrice. Microbiota este săracă (densitatea evaluată la 10^3–10^5 celule/gram), asociată cu

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

suprafața epiteliului, fiind protejată de secreția de mucus și de bicarbonat. Bacteriile prezente sunt acidotolerante: *Lactobacillus* sp. *Streptococcus* sp., *H. pylori*. Ultimul pare a fi implicat în producerea gastritei, a ulcerului gastric și duodenal și este asociat cu malignitatea gastrică.

Intestinul subțire oferă trei regiuni majore, cu conditii de mediu distincte, care influențează dezvoltarea microbiotei: duoden, jejun și ileon. În condiții normale, microbiota este limitată la acest nivel (10^5 celule/ml) și predomină lactobacilii și enterococii anaerobi: *Lactobacillus sp., Enterococcus faecalis, Bifidobacterium sp., Bacteroides sp., Clostridium sp., Candida albicans,* unele derivate în mod cert din cavitatea bucofaringiană.

În ileon pot fi găsite bacterii provenite din colon. Dacă se produce obstrucția tractului intestinal are loc staza, iar microbiota se aseamănă cu cea din colon (*Bifidobacterium sp., Bacteroides sp., Clostridium sp., E. coli, Enterococcus sp.*) și duce la malabsorbție.

Factorii limitanți ai multiplicării bacteriilor în intestinul subțire sunt aciditatea gastrică, peristaltismul intestinal care asigură tranzitul relativ rapid spre intestinul gros și existența unor substanțe care inhibă creșterea microorganismelor.

Microbiota intestinului gros. La om si la cele mai multe mamifere, microbiota acestui segment este alcătuită din câteva sute de specii bacteriene intolerante la O_2, dintre care puține au fost cultivate *in vitro* și identificate. În ceea ce privește densitatea celulelor, anaerobii predomină de circa 1000 de ori în raport cu bacteriile facultative. Microorganismele alohtone devin semnificative dacă densitatea lor depășește 10^6 celule/g de conținut intestinal. Ele provin din alimente sau din etajele superioare ale tractului digestiv.

La om, numărul bacteriilor strict anaerobe este de peste 10^{11} celule/g (30% din masa fecală), în care predomină *Bifidobacterium* sp., grupul *Bacteroides fragilis, Clostridium perfringens*, cocii anaerobi Gram pozitivi (*Peptostreptococcus, Enterococcus sp.*), în timp ce bacteriile facultativ aerobe reprezintă până la 4% din totalul speciilor (coliformii – 0,1–1%, proteae, pseudomonade, lactobacili, *Candida* etc.). Peste 100 de tipuri distincte cresc pe medii de cultură, însă numărul speciilor este evaluat la circa 500. În colonul normal nu se găsesc protozoare. Multe bacterii sunt aderente de celulele epiteliale ale mucoasei sau chiar inclavate între acestea.

Microorganismele gastrointestinale îndeplinesc funcții nutriționale cu importanță diferită la rumegătoare și la mamiferele monogastrice. La rumegătoare, rolul microorganismelor indigene este esențial, în timp ce la animalele monogastrice și la om, este mai curând accesoriu. Bacteriile intestinale sintetizează vitamina K, convertesc pigmenții biliari în acizi biliari, degradează compușii chimici rezistenți la acțiunea enzimelor digestive și au efect antagonic față de agenții patogeni.

Microbiota colonului poate determina complicații severe, când integritatea barierei intestinale este compromisă (apendicite etc.). Bacteriile coliforme, originare în colon produc infecții genito-urinare. NH_3 produs de bacterii prin dezaminarea aminoacizilor nedigerați este toxic. Efectul se manifestă atât asupra mucoasei colonului, generând leziuni ale acesteia, cât și asupra ficatului. Microbiota ar putea fi implicată, direct sau indirect în geneza neoplaziei de colon. Incidența bolilor colonului, în general este mult redusă la populațiile care consumă multe fibre vegetale, comparativ cu cele care au un regim bogat în grăsimi și proteine.

Reacțiile Fenton. Radicalii liberi produși de microbiota intestinală pot avea acțiune mutagenă și genotoxică. Activitatea respiratorie a bacteriilor intestinale produce radicalul superoxid, care în prezența Fe, poate genera radicalul $OH^{\cdot}$.

Cea mai mare parte a Fe alimentar nu este absorbit, ci rămâne în intestin, la concentrații calculate de peste 10 ori mai mari decât cele tisulare. Conținutul intestinal are nivele crescute de pigmenți biliari (bilirubină și biliverdină), care leagă Fe (agenți chelatori) într-o formă capabilă să favorizeze reacțiile Fenton ale radicalului superoxid:

$$O_2^{\cdot} + Fe^{3+} \text{ ---- } O_2 + Fe^{2+}$$
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \text{ ---- } Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-}$$

S-a calculat că microbiota în conținutul intestinal adiacent mucoasei colonului poate genera radicali $OH^{\cdot}$ liberi la o rată corespunzătoare celei produse de peste 10 000 razi de iradiere γ/zi.

Radicalii $OH^{\cdot}$ produși prin reacția Fenton sunt reactivi extrem de electrofili, ce pot reacționa cu legăturile bazelor ADN și pot scoate oxigenul din deoxiriboză. Această reacție produce ruperi monocatenare de ADN, care dacă nu sunt reparate, produc mutații. Fe chelat este mai eficient decât cel nechelat, în producerea modificărilor bazelor ADN.

Fermentația în intestinul gros. La animalele adulte și la om, în funcție de cantitatea de alimente ingerate și de natura lor, materialele ce nu pot fi degradate de enzimele acestora în stomac și în intestin, sunt reținute temporar în intestinul gros și devin surse de energie utilizabile de microbiota

intestinului gros: la resturile alimentare nedigerate se adaugă macromolecule endogene aparținând unor clase diferite de polizaharide ca, de exemplu, mucus gastrointestinal, imunoglobuline, acizi nucleici, constituenți ai celulelor descuamate etc., precum și unele glucide cu moleculă mică (stahioza din fasole etc.). O proporție importantă a acestui material este sub formă insolubilă – fibrele vegetale formate din celuloză, hemiceluloze, xilan, particule de amidon rezistente la degradare, pectine. În plus, celulele mucoase ale glandelor epiteliului intestinal produc mucină insolubilă, abundentă, ce tapetează epiteliul intestinal și ușurează tranzitul conținutului.

Materialele particulate constituie suportul pe suprafața căruia comunitățile bacteriene se dezvoltă sub forma biofilmului aderent la substrat. Prelungirea intervalului de tranzit a acestui material oferă timpul necesar dezvoltării comunităților bacteriene specializate pentru degradarea materialului particulat.

Celuloza este adeseori o componentă importantă din punct de vedere cantitativ a materialului particulat și hidroliza ei are impact energetic semnificativ asupra microbiotei intestinului gros. Hidroliza celulozei disponibilizează resurse energetice pentru toată comunitatea bacteriană. Organismele care hidrolizează celuloza se găsesc în microbiota intestinală a tuturor indivizilor umani, dar structura comunității în ceea ce privește speciile componente diferă în funcție de statutul metanogenic al individului. La cei care nu produc CH_4 (lipsesc *Archaea*), bacteriile celulozolitice aparțin grupului *Bacteroides*, iar la cei care produc CH_4, speciile celulozolitice aparțin grupului *Firmacutes*.

Bacteriile celulozolitice trebuie să degradeze polizaharidele matricei (xilani, manani, pectine), pentru a avea acces la fibrele de celuloză. Produsele solubilizate devin disponibile altor membri ai comunității prin fenomenul hrănirii încrucișate (*cross-feeding*). Hrănirea încrucișată este ilustrată de competiția pentru H_2 produs de bacteriile care degradează polizaharidele, între metanogene, acetogene și sulfat-reducători în ecosistemele anaerobe.

La bolnavii cu deficiență genetică a lactazei, aceasta devine disponibilă pentru fermentație în intestinul gros. Nu se știe în ce măsură, în intestinul gros ajung componente ale cărnii ingerate. Hidroliza substanțelor complexe și transportul produșilor rezultați, sunt catalizate de sisteme enzimatice bacteriene inductibile. Sinteza enzimelor hidrolitice este blocată prin represie sau activitatea lor este inhibată prin feed-back. Fermentația este asigurată de o comunitate complexă de bacterii care atacă hexozele cu producere de acizi grași volatili (acetic, propionic, n-butiric, izobutiric, valeric, izovaleric și caproic), metan, CO_2. O parte din acizii grași rezultați în fermentație sunt absorbiți prin peretele colonului, trec în sânge și sunt metabolizați de organismul gazdei (Savage, 1986).

Unele microorganisme intestinale sintetizează în exces față de nevoile proprii, o serie de vitamine pe care le eliberează în lumenul intestinal (acid folic, piridoxină, biotină, acid pantotenic, riboflavină, vitamina K, vitamina B_{12}). Nu se știe în ce măsură ele sunt preluate efectiv de organismul uman, deoarece sunt produse în special de organisme din cecum și colon. Uneori, efectul este invers, de deficit de vitamina B_{12} pentru om, în urma consumării ei de către microorganismele intestinale. În plus, bacteriile se lizează și eliberează în sistemul digestiv al mamiferelor, toate componentele celulare.

Unul dintre produșii azotați prezenți în intestinul gros este *ureea*, unde ajunge prin difuzia din sângele capilarelor. Bacteriile o hidrolizează la CO_2 și NH_3, ultimul fiind folosit pentru biosinteze.

În cursul fermentației se produc cantități importante de gaze (CO_2, H_2, H_2S, CH_4), apreciate la 200-2000 ml/zi (Mallison, 1987). La circa 33% dintre indivizii umani, produsul major este metanul. O mare parte din H_2 și CH_4 sunt absorbite în sânge și sunt eliminate la nivel pulmonar. Producerea simultană de CH_4 și H_2 este rară, deoarece H_2 este folosit pentru reducerea CO_2 la metan.

Microbiota normală grăbește tranzitul digestiv, care este mult mai lent la animalele *germ-free*, probabil ca rezultat al acțiunii sinergice a unor constituenți chimici sau fizici din alimentație și a produșilor finali de metabolism bacterian, asupra proceselor de neurotransmitere la mușchii netezi.

Sistemul ecologic microbiotă/intestin poate fi perturbat prin: a) administrarea unor substanțe antibiotice care distrug microorganismele sensibile creând disbioze; b) infecții sau alte boli ale sistemului.

Microbiota normală influențează rata de turnover a enterocitelor. Rata înlocuirii acestor celule este de două ori mai mare la animalele convenționale de laborator decât la cele axenice.

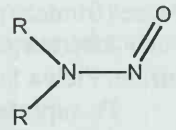
Microbiota normală are funcția de barieră antiinfecțioasă, care protejează organismele animale de implantarea unor organisme alohtone, ce pătrund împreună cu alimentele sau apa. Funcția de barieră protectoare antiinfecțioasă este pregnant evidențiată de comportamentul diferit al animalelor axenice (*germ-free*) față de cel al animalelor convenționale. Șoarecii axenici pot fi infectați *per os*, cu mare ușurință de *Sh. flexneri* sau cu *S. enteritidis* (10 celule bacteriene). Ele se multiplică, se

stabilizează şi se păstrează la densitatea de 1–10 miliarde celule/g de conţinut intestinal. Animalele holoxenice (convenţionale) elimină microorganismele infectante, cu aceeaşi rată cu care îndepărtează un marker de control inert (sporii de *B. subtilis*, termofili, incapabili să germineze). Doza infectantă este de 10^6 celule de *S. enteridis*. Fenomenul a fost descris sub denumirea de "efect de barieră" (Ducluzeau, 1979), iar ulterior a fost denumit *interferenţă bacteriană.*

Populaţiile de microorganisme din sistemul digestiv şi gazda lor formează un sistem ecologic al cărui echilibru este indispensabil pentru sănătatea individului. În acest sistem se realizează o serie de interacţiuni complexe, sinergice şi antagonice, pe de o parte între diferitele populaţii de microorganisme, iar pe de alta parte, între ele şi gazda lor, care asigură echilibrul sistemului. Administrarea antibioticelor cu spectru larg (neomicină, eritromicină) pentru 1–2 zile, poate să inhibe temporar dezvoltarea microbiotei intestinale, în special a celei aerobe (stările de *disbioză).* Metronidazolul inhibă componenta anaerobă a microbiotei.

Unele observaţii de laborator demonstrează existenţa unor efecte negative ale microbiotei normale. Unele microorganisme indigene pot favoriza pătrunderea unui microorganism patogen în organismul gazdă. *Entamoeba histolytica* este întotdeauna comensală în intestinul gros, la animalele de laborator. Stabilirea ei în organismele-gazdă depinde de microbiota rezidentă. De aceea, animalele axenice sunt foarte rezistente la infecţie. Rarele episoade de patogenitate la animalele convenţionale sunt determinate, dupa Mackwiak (1982), de intervenţia factorilor de virulenţă proveniţi de la bacteriile intestinale indigene.

Relaţia dintre microbiota normală şi neoplazie a devenit evidentă după ce s-a demonstrat că microorganismele pot hidroliza substanţe inofensive, din care rezultă compuşi cancerigeni. Prin reducerea nitratului şi aminelor (conservanţi ai alimentelor) de către microorganisme pot rezulta *nitrozamine* (Walker, 1973). Unele microorganisme intestinale pot sintetiza nitrozamine *in vivo*, la pH neutru.



Structura generală a nitrozaminelor.

Translocaţia bacteriilor din intestin. Translocaţia este fenomenul de trecere a bacteriilor din lumenul intestinal în ganglionii mezenterici, urmat adesea de localizare în diferitele situsuri extraintestinale. Translocaţia are loc cu precădere la persoanele imunosupresate, expuse unor mari traumatisme sau intervenţii chirurgicale şi determină complicaţii infecţioase grave, adesea sistemice.

Translocaţia se realizează, de obicei, exclusiv cu bacterii aerobe şi facultative aerobe: *E. coli, K. pneumoniae, Proteus mirabilis, Enterococcus sp., Lactobacillus sp., C. albicans* şi probabil *Staphylococcus* sp., dar si cu bacterii patogene*: Salmonella* sp., *L. monocytogenes.*

Prin contrast, în mod normal, bacteriile strict anaerobe nu sunt expuse translocaţiei din intestin şi produc arareori complicaţii infecţioase. Ele pot fi translocate numai în cazurile în care integritatea mucoasei intestinale este grav compromisă (după iradiere letală, arsuri grave, ischemie mezenterică acută, administrare orală de acid ricinoleic etc.).

Bacteriile strict şi facultativ aerobe sunt translocate prin epiteliul intestinal histologic intact. Celulele epiteliului intestinal – în special cele ileale – ar reprezenta poarta principală de intrare, iar ganglionii limfatici mezenterici ar fi cei mai sensibili. Wells (1990) consideră că enterocitele fagocitează bacteriile şi le eliberează la polul bazal, în lamina proprie. De aici pot lua calea limfatică, spre ganglionii limfatici mezenterici, sau ajung la ficat pe cale vasculară.

Bacteriile strict anaerobe nu se pot transloca, deoarece se leagă greu de enterocite, neavând situsuri-receptor pentru celulele epiteliale intestinale. Ele trec numai prin epiteliul lezat. Raportul dintre celulele anaerobe şi cele strict sau facultativ aerobe în intestin oscilează între 100:1 şi 1000:1, ceea ce denotă că translocaţia nu este dependentă de densitate.

3.4. Microbiota normală a tractului urogenital

Tractul urogenital este steril, cu excepţia uretrei şi a vaginului. Microorganismele pot să migreze ascendent prin uretră, până în vezica urinară, dar în mod normal sunt rapid eliminate de anticorpii din secreţii, de acţiunea microbicidă a celulelor epiteliale ce căptuşesc vezica, precum şi de fluxul urinar descendent.

Uretra feminină este colonizată de un număr mare de lactobacili, streptococi şi stafilococi coagulază-negativi. Bacteriile de origine fecală (*E. coli, E. faecalis, P. mirabilis, C. albicans*) pot

coloniza tranzitoriu uretra, dar când ajung în vezica urinară, proliferează şi produc infecţii ale tractului urinar.

Microbiota vaginală este mai abundentă şi mai diversificată. Predomină lactobacilii (bacilii Dőderlein), deoarece se multiplică în mediu acid. Alţi anaerobi vaginali sunt *Bifidobacterium sp., Peptostreptococcus sp., Porphyromonas sp.*, iar bacteriile aerobe sunt reprezentate de *Staphylococcus sp., Streptococcus sp., Corynebacterium sp., Mycoplasma sp., Candida sp.* În mod obişnuit, *Trichomonas sp.*este prezent în număr mic, dar poate prolifera şi produce vaginita.

3.5. Microbiota normală a pielii

Pielea nu oferă condiţii favorabile dezvoltării microorganismelor, deoarece este expusă unor variaţii extreme de temperatură, umiditate, dezinfectanţi chimici (săpun, şampon). De aceea, populaţia microorganismelor este mult mai mică şi mai simplă comparativ cu alte situsuri ale organismului. Totuşi, numeroase bacterii îşi stabilesc rezidenţa permanentă pe suprafaţa pielii. În plus se produce şi o colonizare tranzitorie cu o diversitate de microrganisme din mediul extern şi cu microorganisme endogene.

Suprafaţa pielii este foarte heterogenă. Există arii uscate şi fără păr (palme, tălpi), arii cu o mare densitate a glandelor sudoripare (regiuni axilare, inguinale, perianală) şi arii bogate în glande sebacee (fruntea, pliurile nazolabiale).

Microorganismele proliferează în mediu umed: zonele cu glande sudoripare şi suprafeţele ocluzate. Pielea feţei, aria perirectală sau perigenitală au o microbiota mai complexă.

Pe suprafaţa pielii, bacteriile anaerobe sunt de 10-100 de ori mai numeroase decât cele aerobe. În raport cu levurile, predomină net bacteriile şi în special, cele Gram pozitive: stafilococi aerobi şi anaerobi (*S. epidermidis, S. viridans* şi alţi stafilococi coagulază-negativi), ocazional *S. aureus, Enterococcus* sp., *Micrococcus sp., Corynebacterium sp., Peptostreptococcus sp., Propionibacterium sp.*

Bacilii coliformi Gram negativi colonizează tranzitoriu suprafaţa pielii, deoarece peretele celular subţire nu protejează celula de acţiunea detergenţilor. *Acinetobacter sp.* se găseşte în zonele umede: regiunea inguinală, axilară, pe tegumentul interdigital. Fungii filamentoşi şi levurile sunt adeseori prezente în pliurile tegumentului, iar micobacteriile acidorezistente nepatogene populează ariile bogate în secreţii sebacee (urechea externă, ariile genitale).

3.6. Microorganismele probiotice

Conceptul de *"probiotic"* a fost formulat în 1965 (Lilly şi Stillwell) pentru a descrie substanţele produse de un protozoar (*Tetrahymena pyriformis*) care favorizează creşterea altui protozoar (*Stylonychia* sp.). Parker (1974), sub denumirea de *probiotic, reuneşte orice supliment alimentar, care are efect favorabil asupra gazdei, prin modificarea microbiotei intestinale.*

Fuller (1989) consideră ca probiotic orice organism viu care adăugat alimentelor are efect benefic asupra organismului gazdă prin ameliorarea echilibrului microorganismelor din sistemul digestiv.

Preparatele probiotice utilizează unul sau mai multe tipuri de bacterii (*Lactobacillus sp., Bifidobacterium* sp.) şi se adaugă în hrana animalelor de crescătorie sub diferite forme (granule, pudră, pastă, capsule).

Un bun probiotic are următoarele caracteristici:

- lipsa de patogenitate şi toxicitate;
- capacitatea de a supravieţui în mediul intestinal;
- să exercite efecte benefice asupra organismului gazdă;
- să fie accesibil din punct de vedere economic;
- să fie stabil prin tehnica de conservare.

Modul de acţiune al probioticelor este relativ puţin cunoscut, dar s-au identificat câteva căi majore:

1) efectul direct, antagonist prin producerea unor metaboliţi de tipul acizilor organici, H_2O_2 sau a unor substanţe macromoleculare cu acţiune antimicrobiană; competiţie pentru nutrienţi; blocarea colonizării bacteriilor patogene prin competiţie pentru situsurile de aderenţă pe suprafaţa epiteliului intestinal;

2) modificarea metabolismului microbiotei intestinale, prin creşterea/diminuarea activităţii unor enzime;
3) stimularea imunităţii prin creşterea activităţii macrofagelor şi a concentraţiei de sIgA.

Efectele produselor probiotice sunt: a) stimularea creşterii în greutate şi protecţia faţă de infecţiile intestinale; b) atenuarea fenomenelor de intoleranţă la lactoză prin deficienţa congenitală a beta-galactozidazei; c) *Lactobacillus* sp. exercită un efect anticancerigen prin inhibarea creşterii celulelor tumorale şi a bacteriilor, care prin activitatea lor enzimatică eliberează substanţe cancerigene din complexe inofensive.

3.7. Gnotobioza şi animalele gnotobiotice

Conceptul de animal axenic (*germ-free*) a fost enunţat de Pasteur încă din 1885. El considera că viaţa animalelor este imposibilă în absenţa microorganismelor. Abordările experimentale ale lui Thierfelder şi Nuttall (1895) au invalidat concepţiile lui Pasteur. Reyniers (1949) a stabilit condiţiile tehnice speciale pentru obţinerea animalelor gnotobiotice.

Terminologia utilizată în studiile de gnotobiologie a fost propusă de Reyniers (1949) şi completată de Luckey (1963) şi Gordon şi Pesti (1971).

Gnotobiotic (gr. *gnotos* = cunoscut) este animalul scos prin intervenţie cezariană sau ecloziune sterilă din ou, crescut şi menţinut continuu în condiţii de izolator, prin tehnici *germ-free*.

Gnotofor – animal purtator al unei (unor) specii cunoscute de microorganisme inoculate în mod deliberat.

Axenic (steril sau *germ-free*) – animal lipsit de orice microorganism viabil.

Monognotofor – animal axenic, inoculat cu o singură specie cunoscută de microorganisme.

Dignotofor – animal axenic inoculat cu doua specii de microorganisme cunoscute.

Gnotobiologie – biologia sistemelor în care sunt prezente numai specii cunoscute.

Convenţional – animal crescut în condiţii obişnuite, în mediu deschis, care conţine *microorganismele asociate* tractului digestiv, pe tegument, etc.

Convenţionalizate – animal axenic, trecut ulterior în condiţii de viaţă liberă.

SPF ("*S*pecific *p*athogen *f*ree")– animale purtătoare ale unei microbiote convenţionale normale, în absenţa oricărui microorganism patogen cunoscut.

Mamiferele "sterile" se obţin prin intervenţie chirurgicală cezariană, în spaţiu steril, urmată de histerectomie şi transferul uterului în camera sterilă a unui izolator, în care este eliberat nou-născutul.

Ouăle aflate la sfârşitul perioadei de incubare sunt supuse unei băi dezinfectante, iar ecloziunea are loc într-un dispozitiv sterilizat.

Sistemul izolator de creştere este alcătuit din mai multe compartimente ermetic închise. Fluxul de aer, hrana şi apa sunt sterilizate.

Au fost crescute în condiţii axenice, gândaci şi melci, raţe, găini şi prepeliţe, şoareci, şobolani, cobai, iepuri, oi, câini, porci, bovine, maimuţe şi ponei. Ele au fost păstrate în condiţii de sterilitate microbiologică mai multe generaţii, cu un comportament aparent normal.

3.7.1. Caracteristicile animalelor *germ-free*

Animalele axenice sunt, în esenţă, animale normale, care diferă de cele convenţionale prin absenţa microbiotei asociate.

Din punctul de vedere al ratei de creştere, al capacităţii de reproducere şi al longevităţii sunt comparabile celor convenţionale sau chiar superioare. Fenomenele de îmbătrânire sunt mai lente, sau durata vieţii este chiar prelungită (găini, maimuţe).

Organele care sunt în contact continuu şi intim cu microorganismele sau cu antigene provenite din acestea (ficatul, intestinul, ganglionii limfatici) sunt mai mici decât la animalele convenţionale. În schimb, cecum-ul la rozătoare şi guşa, oasele şi intestinul gros la puii de găină sunt mai mari decât la animalele convenţionale.

Cecum-ul la rozătoare (şoarece, şobolan, cobai) este mult mărit la animalele axenice, iar conţinutul său este de 5 ori mai mare decât la animalele convenţionale. Dimensiunile sale revin la

normal după inocularea animalelor cu *E. coli, Proteus vulgaris, Streptococcus faecalis*, etc. Microbiota ar avea rolul de asigurare al tonusului peretelui intestinal.

Ganglionii limfatici, la animalele axenice sunt subdezvoltați, iar numărul limfocitelor este redus. Concentrația imunoglobulinelor este de numai 15–50% din normal. Sinteza lor este indusă de antigene bacteriene sau de altă natură, prezente în hrana sterilizată, capabile să inducă imunizarea după administrarea orală.

Pleasants a obținut în 1973 animale cu stare imunitară de bază, în absența oricărei stimulări antigenice (*antigen-free*), prin hrănire cu o dietă hidrosolubilă (aminoacizi, glucoză, vitamine, săruri minerale etc.). La organismele *antigen-free* concentrația imunoglobulinelor este nedetectabilă prin tehnicile obișnuite.

3.8. Rolul microbiotei normale

Microbiota rezidentă are de regulă rol benefic atât pentru microorganisme, cât și pentru gazdă, în sensul că fiecare furnizează și respectiv primește ceva esențial.

Microorganismele de pe suprafața corpului și de pe mucoase sunt saprobionte comensale, dezvoltarea lor fiind influențată de temperatură, umezeală, disponibilitatea nutrienților și de factorii inhibitori. Prezența microbiotei rezidente nu este esențială pentru viață, deoarece organismele *germ-free* trăiesc în absența totală a microorganismelor.

Studiile experimentale asupra animalelor axenice au arătat ca microbiota normală, în special intestinală, exercită efecte benefice asupra organismului gazdă:

- stimulează dezvoltarea organelor cu care vine în contact direct;
- sintetizează vitamine (vitamina K, acidul folic, acidul nicotinic, biotina, riboflavina, piridoxina, tiamina și acidul pantotenic), necesare metabolismului gazdei și favorizează absorbția nutrienților;
- stimulează mecanismele de apărare a gazdei;
- împiedică colonizarea tegumentului și a mucoasei cu agenți patogeni prin fenomenul *interferenței* bacteriene. Mecanismul interferenței poate să implice competiția pentru situsurile de legare pe celulele gazdei, competiția pentru nutrienți, inhibiția reciprocă prin produse de metabolism sau prin produse toxice, inhibiția prin substanțe antibiotice sau prin bacteriocine etc. Supresia microbiotei normale favorizează popularea mucoaselor cu microorganisme din mediul extern sau din alte zone corporale, care se comportă ca oportuniste și devin patogene;
- degradează compuși chimici alimentari, care nu pot fi hidrolizați de sucurile digestive;
- favorizează eliminarea fecală a colesterolului.

Microbiota normală este adaptată la modul de viață neinvaziv, dar în anumite condiții, după ce trec în sânge sau în țesuturi, microorganismele rezidente pot deveni patogene. De exemplu, streptococii viridans populează tractul respirator superior, dar dacă pătrund în sânge (după extracția dentară sau tonsilectomie) se localizează pe valvele cardiace și produc endocardita infecțioasă. Speciile de *Bacteroides* sunt cele mai comune bacterii rezidente în colon și sunt inofensive, dar dacă trec în cavitatea peritoneală sau în cea pelviană consecutiv unor procese traumatice sau inflamatorii, produc supurații sau bacteriemii.

Deși microbiota exercită efecte favorabile multiple asupra organismului gazdă, ea nu este esențială și nu este indispensabilă pentru viața acestuia. Datorită evoluției îndelungate s-a creat o stare de dependență a gazdei de anumiți stimuli, în special bacterieni.

Bibliografie

Wexler H. M. 2007. Bacteroides: the Good, the Bad and the Nitty-Gritty. Clin. Micr. Reviews, 20, 4, 593–621.

Xiaojing L., Kolltveit K. M., Tronstad L. Olsen I. 2000. Systemic Diseases Caused by Oral Infection. Clin. Micr. Reviews. 13, 547–558.

Donlan R. M., Costerton J. W. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms – Clin. Micr. Reviews, 15, 1, 167–193.

BCU IAȘI CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

Dune W., Michael Jr. 2002. Bacterial Adhesion: Seen any Good Biofilms Lately? – Clin. Micr. Reviews. 15, 1, 155–166.
Orhage K., Nord C. E. 2000. Bifidobacteria and lactobacilli in human health. Durgs Exptl. Clin. Res. 2000, XXVI (3):95–111
Todar K. 2009. Online textbook of bacteriology
Blatner A. 2009. Stories in the History of Medicine" lecutre given at the Senior University Georgetown's Winter-Spring 2009 session.
Taubman M. A., Nash D. A. 2006. The scientific and public-health imperative for a vaccine against dental caries. Nature Reviews Immunology 6, 555–563
Curtis J. 2009. Periodontitis (advanced gum disease). Health.com
Pleasants J. R., Reddy Bandaru S., Hessling J. J., Reyniers J. P., Wostmann B. S. 1973. Effect of Germfree Status, Lactation and Fasting Time on Plasma Amino Acids of C3H Mice Annual meetings of the Federation of American Societies for Experimental Biology, Atlantic City, N.J.
Nuttall G. H. F, Thierfelder H. 1895.Thierisches leben ohne bakterienim verdanungkanol. Z Physiol Chem 21:109–121
Reyniers J. Atrexler P. C., Ervin R. F., Wagner M., Luckey T. D., Gordon H. A. 1949. A Complete Life-Cycle in the "Germ-Free' Bantam Chicken Nature 163, 67–68
Luckey T. D. 1963. Germ free life and gnotobiology. New York: Academic Press.
Lilly D. M., Stillwell R. H. 1965. Probiotics: growth promotic factors produced by microorganisms. Science 147:747–748 Gordon H. A., Pesti L. 1971. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host-microbial relationships. Bacteriol Rev. 35:390–429
Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol. 66:365–378
Parker R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. Anim Nutr Health. 29:4–8.
Ducluzeau, R., Raibaud P. 1979. Écologie microbienne du tube digestif. Masson S.A., Paris.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. PROPRIETĂŢILE MICROORGANISMELOR PATOGENE: PATOGENITATEA ŞI VIRULENŢA BACTERIANĂ

Din multitudinea de microorganisme existente în natură, un număr limitat sunt capabile să se dezvolte în asociație cu organismele superioare, iar dintre acestea, un număr restrâns (câteva sute) sunt *patogene*.

Bacteriile patogene au două proprietăți definitorii: *patogenitatea* şi *virulența*. Cei doi termeni au semnificație distinctă.

4.1. Definiţii

Patogenitatea (gr. *pathos* – boală, suferință; gr.-*geneia*, fr. *génie* – născut, produs al) este proprietatea esențială a oricărui agent patogen ce constă în capacitatea acestuia de a genera un proces infecțios, acelaşi din punct de vedere clinic, manifestat prin starea de boală, atunci când pătrunde în organismul sensibil pe cale naturală sau pe cale experimentală. Un microorganism patogen este capabil să inducă leziuni tisulare la o gazdă receptivă. În mod obişnuit, patogenitatea este asociată, inexact, cu modul de viață parazitară a microorganismelor, dar calitatea de patogen nu se asociază totdeauna cu parazitismul. Majoritatea bacteriilor patogene sunt parazite, iar *in vitro* se dezvoltă ca *saprobionte* pe medii organice, uneori cu compoziție chimică complexă. Unele bacterii, deşi sunt strict saprobionte, adică se dezvoltă pe materia organică în mediile naturale (de exemplu, *Cl. botulinum*), dar fără a fi parazite, produc totuşi efecte patologice prin intermediul exotoxinelor pe care le secretă.

Patogenitatea a apărut în cursul co-evoluției gazdă-parazit şi implică existența a patru proprietăți esențiale:

- pătrunderea şi localizarea în țesuturile gazdei;
- multiplicarea şi producerea de toxine/invadarea gazdei;
- inducerea unui răspuns imun şi rezistența la mecanismele de apărare ale gazdei;
- producerea leziunilor specifice.

Patogenitatea este un caracter calitativ de specie. De exemplu, *B. anthracis, C. diphteriae, S. typhi, M. tuberculosis* sunt patogene sau *condiționat patogene*, adică determină apariția unui proces infecțios numai dacă sunt inoculate în doze foarte mari sau dacă organismul are o rezistență generală scăzută. Cel mai ilustrativ exemplu de *patogenitate condiționată* este oferit de *Ps. aeruginosa*, o bacterie saprobiontă în mediile naturale: organismul uman împiedică, în condiții obişnuite, colonizarea cu pseudomonade, dar la persoanele imunocompromise, în rănile provocate de arsuri sau de traumatisme sau în țesutul pulmonar al pacienților cu fibroză chistică, *Ps. aeruginosa* produce întotdeauna infecții.

Alte specii (*Azotobacter sp., Nitrobacter sp., Acetobacter sp.* etc.) nu sunt niciodată patogene, pentru că nu au capacitatea de a stabili interacțiuni cu organismele superioare.

Virulența (lb. latină *virulentus* = otrăvitor) este capacitatea relativă a unei tulpini patogene de a determina leziuni tisulare (de a coloniza, de a se multiplica şi eventual de a invada celulele şi țesuturile gazdei şi/sau de a produce toxine), determinând o stare patologică la o gazdă receptivă.

Virulența exprimă *cantitativ* gradul de patogenitate a unei tulpini pentru o anumită gazdă şi este o proprietate *multifactorială,* dependentă de paticularitățile structurale şi fiziologice ale agentului patogen materializate în:

- *infecțiozitate* (sau capacitatea de colonizare);
- *agresivitate* (sau invazivitate);

BCU "IOAN SLAVICI" TIMIŞOARA UNIVERSITY LIBRARY

– *toxigenitate.*

Procesul infecțios

Infecția (lb. latină *inficere* – otravă) este deteminată de capacitatea agentului patogen de a pătrunde, de a se localiza și multiplica în organismele gazdă sensibile. Infecția bacteriană produce modificări de tip alterativ ale organismului gazdă. Ele sunt *primare* (directe), datorate factorilor de patogenitate bacteriană (intoxicații, toxiinfecții, bacteriemii) și *secundare*, mediate de factorii umorali și celulari ai sistemului imunitar (stările de hipersensibilitate).

Factori de virulență

Virulența este corelată cu prezența unor structuri bacteriene (flageli, fimbrii), a unor proteine membranare sau cu unele particularități fiziologice și de sinteză (de exemplu sinteza exotoxinelor sau a exoenzimelor), denumiți *factori de virulență,* care determină producerea unor leziuni în organismul gazdei.

Moleculele care mediază virulența au fost grupate în 4 clase: *adezine, invazine, agresine* și *impedine*. *Adezinele* sunt proteine bacteriene care mediază interacțiunea celulei bacteriene cu o varietate de celule ale gazdei, în special epitelii, ca o primă treaptă de colonizare a gazdei. *Invazinele* sunt proteine bacteriene care permit celulei să intre în celula eucariotă. *Agresinele* sunt molecule, de exemplu toxine și proteaze, care produc leziuni ale gazdei ori favorizează răspândirea infecției. *Impedinele* sunt componente bacteriene care inhibă acțiunea mecanismelor de apărare, fără să producă leziuni.

Moleculele inductoare ale sintezei de citokine sunt, probabil, tot factori de virulență, dar nu aparțin celor 4 clase enumerate mai sus. Componentele care induc sinteza citokinelor, modulează activitatea celulei infectate, cu consecințe patologice și au fost denumite *moduline*.

Analiza genetică a factorilor de virulență bacteriană a arătat că bacteriile patogene se disting de bacteriile nepatogene, prin prezența genelor specifice de patogenitate, adeseori organizate în așa numitele "insule de patogenitate" – aglomerări de gene care aparent au fost dobândite în evoluție, pe calea transferului orizontal al genelor (fig. 30, 31).

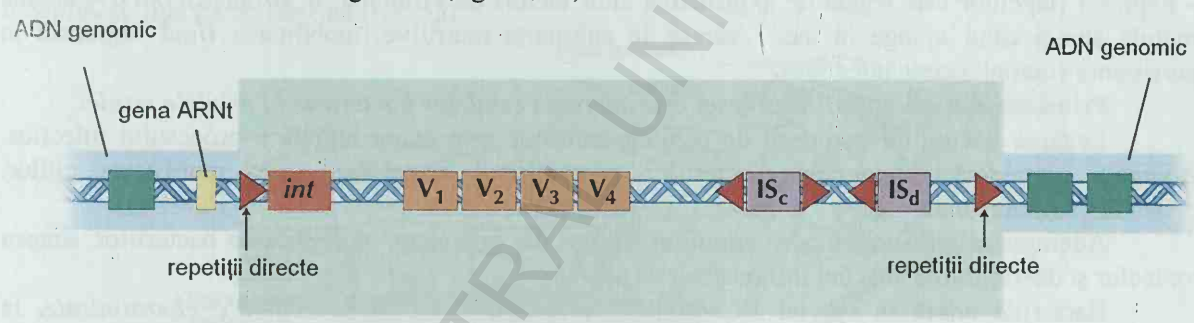


Fig. 30. Structura unei insule de patogenitate (V1-4, gene de virulență), IS (secvențe de inserție) (Barton et al., 2009)

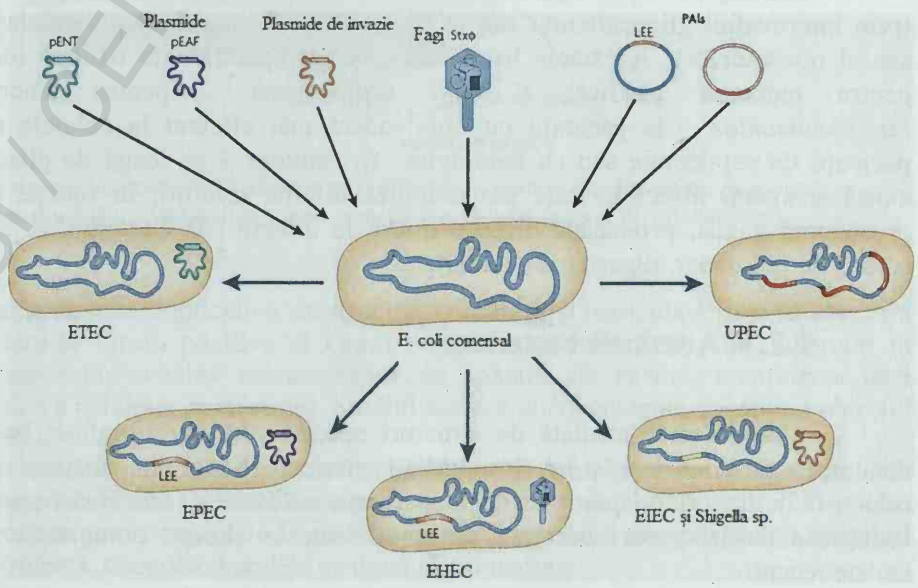


Fig. 31. Reprezentarea evoluției bacteriilor patogene din bacterii comensale prin dobândirea genelor de virulență prin transfer orizontal mediat de diferite elemente genice mobile. PAIs (insule de patogenitate – *pathogenicity islands*) (după Ahmed et al., 2008).

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "GRIGORE T. POPA" IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bacteriile patogene conţin 1–2 insule de patogenitate, dar diferite tulpini de *Salmonella* au până la 5 astfel de secvenţe "insulare" de ADN. Originea comună a genelor codificatoare a factorilor de virulenţă explică faptul că agenţi patogeni cu grad mic de înrudire poartă gene de virulenţă strâns înrudite. Afirmaţia este foarte evidentă pentru un set de aproximativ 20 de gene, codificatoare ale unui set de proteine care definesc un mecanism de patogenitate, denumit *sistem de secreţie de tip III*.

Scopul practic al cercetării proprietăţilor de virulenţă a unui agent patogen este obţinerea unor mijloace de contracarare a exprimării sau acţiunii factorilor de virulenţă (vaccinuri) pentru a preveni infecţia.

4.2. Infecţiozitatea

Infecţiozitatea reprezintă capacitatea unui microorganism de a depăşi mijloacele de apărare ale organismului, de a se implanta şi de a coloniza ţesuturile sănătoase, adică de a stabili o localizare şi de a forma un *focar primar de infecţie*. Colonizarea ţesutului de către un microorganism patogen este o fază iniţială critică pentru evoluţia procesului patologic şi este un fenomen complex, care implică atât implantarea, cât şi utilizarea substanţelor nutritive disponibile în mediul gazdei.

Traversarea stratului de mucus de către agenţii infecţioşi este favorizată de prezenţa organitelor de mişcare (flageli), dar şi prin secreţia substanţelor mucolitice (de exemplu, mucinaza produsă de *Helicobacter pylori* şi *Vibrio cholerae*), stimularea secreţiei de mucus, producerea unor toxine care inhibă motilitatea ciliară.

În medii apoase motilitatea este asigurată de flageli dispuşi peritrih, în timp ce flagelii cu localizare polară favorizează traversarea rapidă a mediilor cu vâscozitate crescută, iar fenomenul de hiperflagelare asigură deplasarea pe suprafaţa majorităţii mucoaselor (de exemplu, la *Proteus mirabilis* – expresia flagelilor este legată de exprimarea altor factori de virulenţă; *B. bronchiseptica* – devine mobilă atunci când ajunge în medii sărace în substanţe mutritive, mobilitatea fiind implicată în persistenţa şi cronicizarea infecţiei).

Prima etapă a colonizării unui ţesut este *aderenţa celulelor bacteriene la celulele gazdei.*

Legarea bacteriilor patogene de celulele sensibile este etapa iniţială a procesului infecţios. Aderenţa împiedică îndepărtarea bacteriilor prin: fluxul secreţiilor, tuse, motilitatea cililor, peristaltismul intestinal.

Aderenţa asigură colonizarea anumitor situsuri din organism, multiplicarea bacteriilor, sinteza toxinelor şi desfăşurarea reacţiei inflamatorii de apărare.

Bacteriile aderă în special la *epiteliile mucoaselor*, dar şi la *epiteliile cheratinizate*, la *endotelii*, la *ţesutul osos*, la *smaltul dentar* etc.

Aderenţa la celulele gazdei este *directă* (prin intermediul adezinelor specifice) sau *indirectă* (prin intermediul glicocalixului sau al moleculelor de matrice extracelulară de tipul fibronectinei sau al opsoninelor). Adezinele bacteriene conferă specificitate tisulară (de exemplu, *H. pylori* – pentru mucoasa gastrică; *E. coli* uropatogenă – pentru mucoasa tractului urinar; *Str. pneumoniae* – la pacienţii cu otite, aderă mai eficient la celulele nazofaringelui, decât la pacienţii cu septicemie sau cu meningite; *Str. mutans* – se leagă de glicoproteine salivare), deşi există şi agenţi infecţioşi care pot coloniza diferite ţesuturi, în funcţie de poarta de intrare în organismul gazdă, producând diferite tipuri de infecţii (de exemplu, *B. anthracis* poate produce cărbunele pulmonar, digestiv şi cutanat).

4.2.1. Adezinele bacteriene

Aderenţa este mediată de structuri specializate ale suprafeţei bacteriene, cunoscute sub denumirea generică de *adezine*. Structurile bacteriene de aderenţă, anatomice sau moleculare sunt de cele mai multe ori *adaptative*. Ele dispar prin cultivarea succesivă *in vitro*. De aceea, tulpinile bacteriene de laborator sunt mai puţin aderente la suport, comparativ cu tulpinile bacteriene izolate recent.

Aderența este condiționată de *complementaritatea sarcinilor electrice* ale celor două suprafețe. Cele mai multe bacterii au o *sarcină netă negativă* a suprafeței lor, dar au și zone limitate electropozitive, precum și molecule cu caracter hidrofob.

Aderența reprezintă un avantaj ecologic major pentru bacteriile patogene, cu privire la asigurarea nutrienților, protecția față de anticorpi și lizozim etc. Multiplicarea lor, după aderență, are loc cu o rată net superioară față de a celulelor neaderente.

Mecanismele aderenței bacteriene *in vivo* au fost studiate în special pentru bacteriile generatoare de carii dentare. Aderența celulelor bacteriene patogene la celulele sensibile implică participarea a doi factori: o adezină localizată pe suprafața bacteriei și un receptor de pe suprafața celulei gazdă (fig. 32).

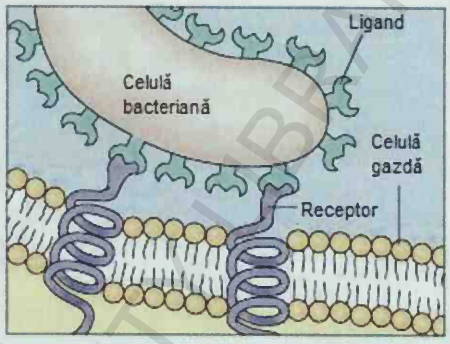


Fig. 32. Reprezentarea schematică a aderenței celulelor bacteriene la celula gazdă sensibilă, mediată de adezine (liganzi) și receptori specifici (http://lib.bioinfo.pl/courses/view/312, http://diverge.hunter.cuny.edu/~weigang/Images/15-01_adherence_1.jpg).

Adezinele bacteriene se împart în două categorii: a) *adezine de natură proteică; b) adezine neproteice.*

Grupul adezinelor proteice cuprinde *fimbriile*, care sunt structuri filamentoase, neflagelare ale suprafeței celulare, diferite de pilii participanți la conjugare. Fimbriile fac parte din categoria lectinelor și se găsesc numai la bacteriile Gram negative. Ele se leagă de receptori specifici ai membranei celulare. Fimbriile care aparțin aceluiași tip sunt formate din molecule proteice identice. Diferitele variante fimbriale se deosebesc prin lungimea filamentului și prin greutatea moleculară a monomerilor polipeptidici constitutivi.

În aceeași categorie sunt incluse o categorie de *proteine* din structura membranei externe a bacteriilor Gram negative sau din structura peretelui celular al bacteriilor Gram pozitive, care îndeplinesc funcția de adezine (fig. 33).

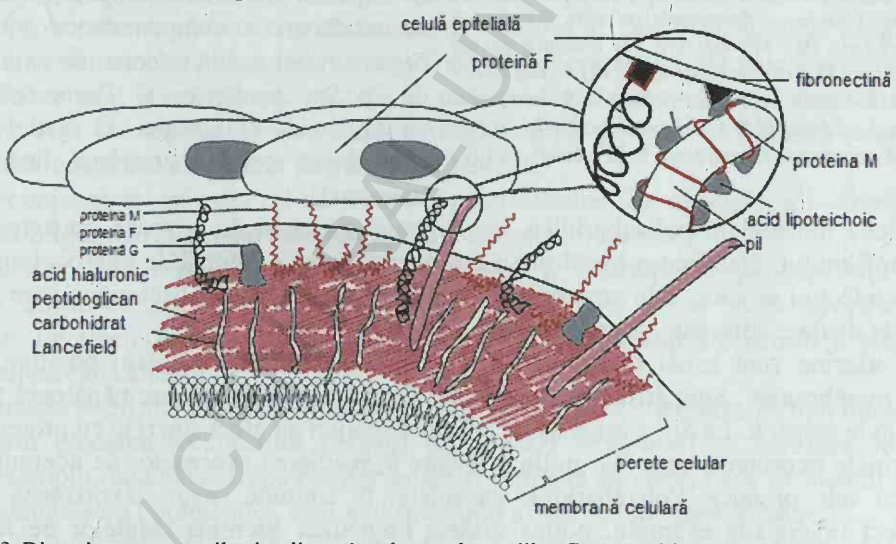


Fig. 33. Diversitatea structurilor implicate în aderența bacteriilor Gram pozitive (*Streptococcus pyogenes*) la celula gazdă sensibilă (http://d3jonline.tripod.com/10-Bacteria/Microbial_Virulence.htm).

Grupul adezinelor neproteice.

O serie de substanțe de natură glucidică, cu structuri complexe și particulare intră în structura peretelui celular al bacteriilor Gram pozitive și Gram negative, exercitând un rol important în patogeneza bacteriană (aderență, evitarea mecanismelor de apărare ale gazdei, menținerea unei anumite încărcături electrice a celulelor bacteriene). Studiul acestor glicoconjugate constituie obiectul glicomicii bacteriene (Reid și colab., 2010) (fig. 34).

Cele mai comune adezine neproteice sunt *polizaharidele* care intră în structura unei rețele de tip *glicocalix*, de tip *capsular* sau a unei structuri neorganizate de tipul *stratului mucos*. Exopolizaharidele formează structuri capsulare la multe bacterii patogene și au consistență de geluri hidratate. Ca factori de virulență, exopolizaharidele au două roluri majore:

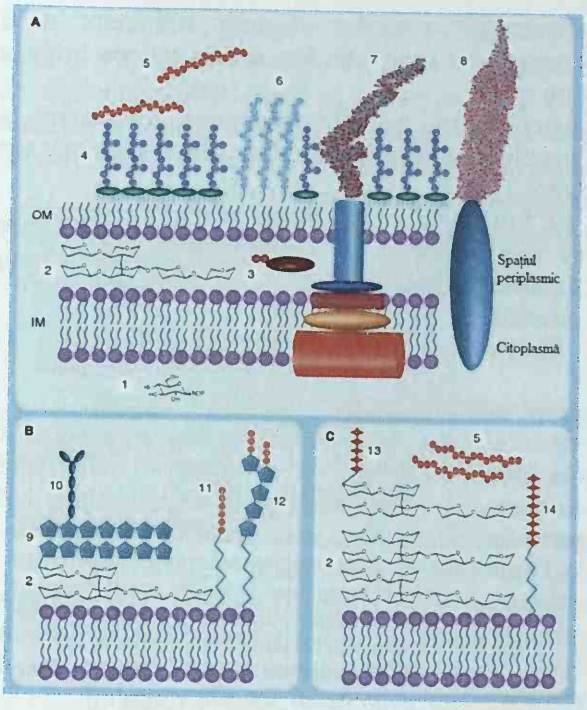


Fig. 34. Diversitatea glicomului bacterian: **(A)** Bacterii Gram negative **(1)** precursori glucidici complexați cu nucleotide; **(2)** peptidoglican; **(3)** Glicoproteine *N-linkate*; **(4)** LPS/LOS; **(5)** polizaharide extracelulare; **(6)** polizaharide capsulare; **(7)** proteine glicozilate *O-linkate – Salmonella enterica*; **(8)** pilină – *Neisseria gonorhoeae* **(B)** Micobacterii **(9)** arabinogalactan **(10)** acizi micolici **(11)** lipomannan and **(12)** lipoarabinomannan. (C) polizaharide capsulare, polizaharide extracelulare, PG **(13)** acid teichoic **(14)** acid lipoteichoic, IM: membrana internă; OM: membrana externă (după Reid și colab., 2010).

a) *aderența la substratul tisular.* După Gristina și colab. (1985), atât suprafața celulei bacteriene, cât și a substratului tisular sunt *polianionice*. Sarcinile electrice asemănătoare determină respingerea celulei bacteriene de către substratul tisular. Forțele de respingere sunt contracarate de forțele de atracție London-van der Waals. Ele permit realizarea unor interacțiuni hidrofobe între moleculele suprafeței bacteriene și ale celulei gazdă. Exopolizaharidele bacteriene intensifică interacțiunile dintre liganzii bacterieni și tisulari. Astfel, țesutul este acoperit de un biofilm, în care agregatul de celule bacteriene, înconjurat de o matrice moleculară, aderă strâns la substrat;

b) *protecția celulei bacteriene* față de sistemele de apărare ale gazdei. Capsula împiedică fagocitoza pentru că bacteriile capsulate formează microcolonii și înglobarea lor de către fagocite devine dificilă. Cu cât suprafața celulei bacteriene este mai hidrofilă, cu atât este mai greu fagocitată. Pe de altă parte, complementul și anticorpii nu au acces la suprafața celulei. Unele specii bacteriene produc o capsulă a cărei compoziție chimică este asemănătoare componentelor tisulare ale organismului gazdă infectat (de exemplu, capsula de la *Str. pyogenes* și *Pasteurella multocida* conțin acid hialuronic. O astfel de capsulă camuflează celula bacteriană față de sistemul imunitar).

Matricea moleculară polizaharidică, cu structură fibroasă favorizează creșterea celulelor și stabilitatea biofilmului. Stabilitatea biofilmului asigură formarea continuă de microcolonii, persistența și extinderea infecției cronice. Din structura sa "scapă" periodic celule bacteriene care trec în sânge sau în lichidele tisulare adiacente, favorizând extinderea infecției.

Alte adezine sunt acizii lipoteichoici, caracteristici bacteriilor Gram pozitive, ancorați de glicolipidele membranare. Sunt structuri moleculare filamentoase, foarte asemănătoare fimbriilor, cu rol de aderență la substrat. La *Str. pyogenes*, acizii lipoteichoici au efect sinergic cu proteina M.

Adezinele neproteice sunt mai puțin eficiente în medierea proceselor de aderență bacteriană, comparativ cu cele proteice. Polizaharidele capsulare, în anumite cazuri favorizează aderența, iar alteori au efect invers (de exemplu, polizaharidele împiedică aderența celulelor de *H. influenzae, N. meningitidis* sau *P. multocida* tip A).

Receptori de adezine. Interacțiunea dintre celula epitelială sensibilă și adezinele bacteriene este mediată de *receptorii de adezine* și se bazează pe principiul complementarității spațiale.

Uneori, interacțiunea este *nespecifică*, ceea ce explică faptul că unele specii bacteriene (*Salmonella* sp., *Yersinia* sp.) infectează atât celulele intestinale umane, cât și liniile celulare de *Drosophila.* sp. Alteori, interacțiunea are un grad înalt de *specificitate*. De exemplu, *Str. pyogenes* se localizează la nivelul epiteliului faringian și foarte rar în tractul urinar, iar *E. coli* colonizează epiteliul intestinal și al căilor urinare, dar foarte rar pe cel respirator.

Helicobacter pylori, un patogen specific uman, aderă la celulele epiteliale ale mucoasei gastrice, dar nu la celulele profunde ale mucoasei sau ale colonului. Pe celulele epiteliului, *H. pylori* recunoaște antigenul de grup sanguin Lewis, dar probabil și alte molecule, deoarece *H. pylori* infectează și indivizi negativi pentru acest antigen. Un factor esențial pentru colonizare este *ureaza*, pe

care *H. pylori* o produce în cantități foarte mari. *In vitro*, celulele de *H. pylori* hidrolizează ureea, eliberând amoniul care neutralizează aciditatea și permite colonizarea inițială. Amoniul generat prin hidroliza ureii produce NH_4OH care se disociază și ionul OH^- produce leziuni ale mucoasei.

Receptorii de adezine ai celulelor epiteliale sunt molecule din familia *integrinelor*, care îndeplinesc funcții fiziologice importante: leagă proteine plasmatice, dar și proteine din matricea extracelulară (fibronectine, fibrinogen, laminina, colagenul de tip I etc.).

Receptorii de adezine sunt molecule ale *suprafeței celulei* sau se găsesc la nivelul *mucopolizaharidelor* care tapetează întotdeauna epiteliile mucoase.

Din punct de vedere chimic, receptorii de adezine sunt glicoconjugate: *glicoproteine* ale membranei celulare sau ale stratului mucopolizaharidic și *glicolipide* din structura membranei (fig. 35).

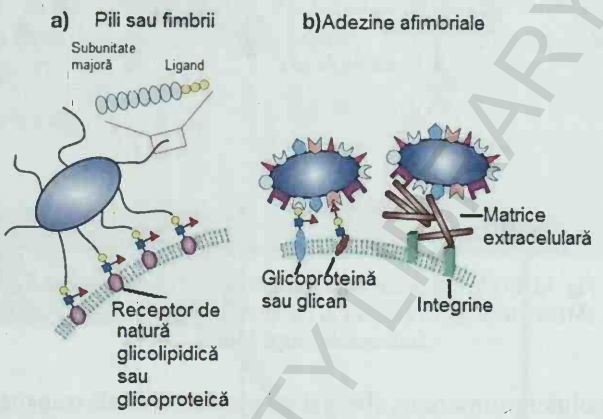


Fig. 35. Reprezentarea schematică a aderenței bacteriene la celula gazdă, mediată de adezine fimbriale sau afimbriale, prin intermediul receptorilor de natură glicolipidică sau glicopeptidică (după Nizet și Esko, 2009).

Glicoproteinele și glicolipidele proemină la suprafața membranei celulare și expun la exterior catene oligozaharidice mai mult sau mai puțin complexe, cu rol de receptori de adezine.

Glicoproteinele din stratul mucopolizaharidic sunt formate din catene polipeptidice legate prin punți S-S. Catena oligozaharidică este formată din N-acetil-galactozamină, N-acetil-glucozamină, fucoză, galactoză și acid sialic. Glicoproteinele din mucus se găsesc și în secreții (salivară, digestive).

Glicoproteinele membranare se deosebesc de cele din mucus: N-acetil-galactozamina lipsește, locul ei fiind luat de manoza și de acizii uronici. Catenele glicoproteice ale mucopolizaharidelor și ale suprafeței celulare sunt asemănătoare cu cele de pe suprafața eritrocitelor și formează antigenele de grup sanguin. Așa se explică proprietățile hemaglutinante pe care le posedă anumite adezine bacteriene, dacă receptorul lor celular se găsește pe hematii.

Glicoconjugatele pot avea rol de receptori pentru toxine. De exemplu, glicolipidul GM_1, prin componenta sa oligozaharidică este receptor specific al toxinei holerice.

Detectarea localizării receptorilor glicoproteici și glicolipidici pe suprafața celulei este posibilă prin utilizarea lectinelor. Lectinele sunt glicoproteine ce se leagă specific cu un rest oligozaharidic. Lectinele cuplate cu un derivat fluorescent sunt utilizate pentru a studia repartiția receptorilor suprafeței celulare.

Modularea expresiei proprietăților de aderență se poate face, teoretic, pe mai multe căi:

- prin blocarea receptorilor celulari cu *analogi structurali ai adezinei bacteriene*. De exemplu, aderența streptococilor poate fi inhibată *in vitro*, dacă la mediul de reacție se adaugă acid lipoteichoic, analogul structural al adezinelor acestor bacterii;
- prin utilizarea *analogilor structurali ai receptorilor celulari*. D-manoza, adăugată în mediul de reacție inhibă aderența *S. typhimurium* și *Sh. flexneri* la eritrocitele de cobai. Bacteriile poartă fimbrii de tip I, ai căror receptori celulari sunt glicoproteine cu manoză (fig. 36);
- blocarea parțială sau totală a adezinei cu *anticorpi specifici* este considerată ca o modalitate eficientă de protecție. Astfel, starea imunitară postvaccinală sau consecutivă unei infecții, asigură o protecție bună față de o infecție ulterioară cu același agent sau cu alți agenți care au adezine comune;
- utilizarea *antibioticelor la doze subinhibitorii* este o modalitate de a modifica expresia adezinelor. Dozele subinhibitorii blochează, parțial sau total, biosinteza unor constituenți ai suprafeței celulare, antrenând și modificări ale anumitor proprietăți, inclusiv a celor de aderență.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

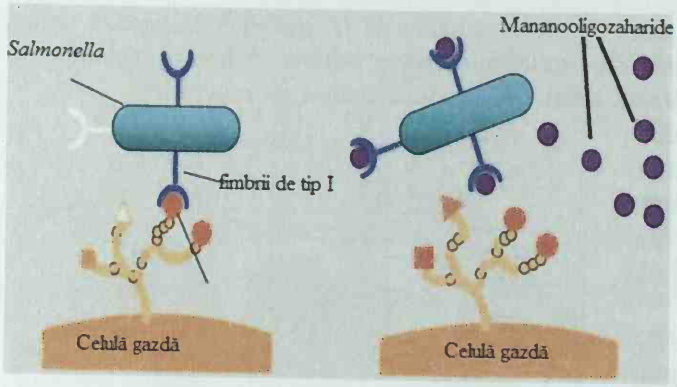


Fig. 36. Evidențierea efectului anti-infecțios al manano-oligozaharidelor (MOS), analogi structurali ai receptorilor pentru fimbriile de tip I la *Salmonella* (după Moran, 2009).

Receptorii celulari de adezine se modifică, atât cantitativ, cât şi calitativ.

Modificările receptorilor celulei gazdă pot favoriza aderența şi invazia tisulară. Un exemplu este infecția severă produsă de *Str. pneumoniae*, care determină infecții clinice (pneumonie, otită medie, septicemie).

Sensibilitatea la infecție creşte foarte mult consecutiv unei infecții virale a tractului respirator. Citokinele gazdei activează receptorul pentru PAF (*platelet activating factor*), pe suprafața celulelor epiteliului pulmonar.

Pneumococii ambelor tipuri de colonii (transparente şi opace) aderă la suprafața celulei pulmonare, dar cei ce produc colonii transparente invadează circulația sistemică prin capilarele pulmonare ori prin vasele limfatice.

Astfel se explică predispoziția pacienților infectați cu un virus al tractului respirator la complicațiile consecutive pneumoniei cu *Str. pneumoniae* (meningită, septicemie).

Interacțiunea unui patogen cu celula gazdă nu este mediată întotdeauna de receptori celulari. Adeseori, bacteriile patogene activează căile de semnalizare ale celulei, direct prin componentele celulare sau prin intermediul citokinelor inflamatorii.

4.2.2. Biofilmele microbiene

Aderența la un substrat reprezintă o etapă inițială a formării biofilmului microbian.

Biofilmul este o *comunitate microbiană sesilă alcătuită din celule ataşate ireversibil la un substrat, la o interfață sau între ele, încorporate într-o matrice de substanțe polimerice extracelulare pe care le-au produs şi manifestă un fenotip modificat cu privire la rata de creştere şi de transcriere a genelor* (Donland şi Costerton, 2002).

Etapele formării unui biofilm. Pentru a forma biofilmul, bacteriile trebuie să adere la un substrat. Condiția inițială este deplasarea microorganismelor din mediu la suprafața substratului, care se poate realiza prin trei mecanisme:

- *prin difuziune* – consecința mişcării browniene a celulelor bacteriene – asigură deplasarea lentă într-un mediu staționar, ca şi în cursul procesului de sedimentare, în care poate reprezenta singurul mod de contact al microorganismelor cu diferite substraturi;
- *prin curenți de convecție,* asociată cu circulația lichidului în care sunt suspendate, poate asigura un transport cu câteva ordine de mărime mai rapid decât cel precedent;
- *mişcarea activă,* cea mai rapidă, poate duce la contacte întâmplătoare sau orientate chimiotactic în cazul existenței unui gradient chimic în regiunea interfacială.

În condiții naturale, orice suprafață inițial „curată", este acoperită în scurt timp de molecule adsorbite, în general, de natură proteică. Încă din faza în care se găsesc la oarecare distanță de substrat, microorganismele sunt expuse forțelor generale fizico-chimice. Aderența la substrat este inițial reversibilă, în sensul unei depuneri pe suprafața suport, cu menținerea în continuare a mişcării browniene şi flagelare şi cu posibilitatea de îndepărtare prin agitare uşoară sau chiar prin propria mobilitate. Un rol important în procesul de aderență au atât interacțiunile London-van der Waals, care sunt de regulă atractive, tensiunea superficială*, legăturile covalente, cât şi forțele electrostatice de respingere. În mediile naturale, datorită structurilor învelişului celular, atât bacteriile Gram negative, cât şi cele Gram pozitive sunt încărcate electronegativ. Energia potențială rezultată din interacțiunea lor este variabilă şi în funcție de concentrația electroliților determină comportarea bacteriilor în raport cu substratul.

*Tensiunea superficială se manifestă la nivelul suprafeței de separare dintre un lichid şi un gaz (sau dintre două lichide nemiscibile). Suprafața lichidului se comportă ca o membrană elastică, ce tinde să se contracte şi să se micşoreze la minimum posibil. Tensiunea superficială este o forță rezultantă a atracțiilor din interior şi exterior, exercitate asupra moleculelor din stratul de separare lichid-gaz sau lichid-lichid.

Etapa de legare ireversibilă sau permanentă este caracterizată prin încetarea mişcării browniene şi prin posibilitatea îndepărtării bacteriilor aderente numai sub acţiunea unor forţe puternice de agitare. Aderenţa este favorizată de prezenţa polizaharidelor extracelulare şi a glicoproteinelor preformate sau sintetizate *de novo* pe suprafaţa celulei care aderă. Fenomenul explică tendinţa superioară de aderenţă la substrat, a bacteriilor în faza exponenţială de creştere, comparativ cu cele aflate în faza staţionară, îmbătrânite sau moarte (fig. 37).

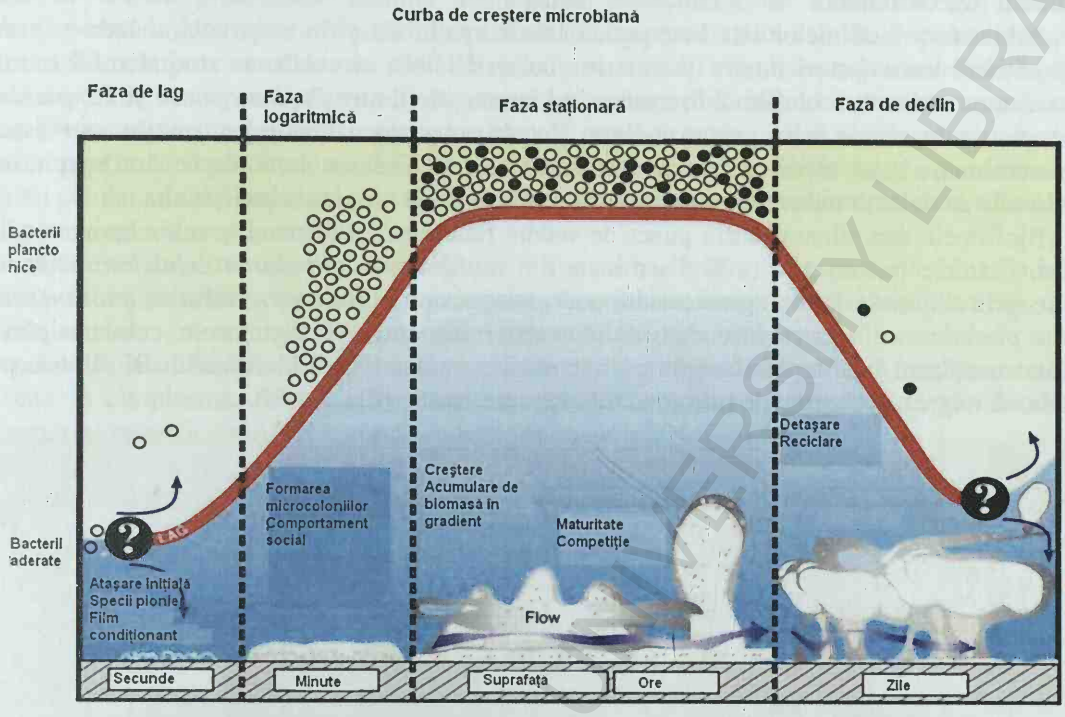


Fig. 37. Prezentarea corelaţiilor dintre densitatea bacteriană, faza de creştere a unei culturi asincrone, în sistem discontinuu, şi etapele formării biofilmului microbian (după Costerton şi colab., 1999).

După legarea fermă, bacteriile încep să crească şi să se multiplice rapid. Celulele legate ireversibil de substrat, dar nu şi între ele, formează un *strat continuu monocelular* care acoperă toată suprafaţa expusă a substratului. Celulele legate atât de substrat, cât şi între ele formează *microcolonii* şi *biofilme*. Ulterior, biofilmele rezultate din creşterea pluristratificată a bacteriilor pot fi colonizate şi de alte specii incapabile, *per se,* să colonizeze suprafeţe străine, care pot contribui la organizarea mai complexă a biofilmului. Se adaugă, uneori, cantităţi importante de polimeri specifici cu structură reticulată sau fibrilară, care ancorează suplimentar celulele de substrat şi unele de altele (fig. 38).

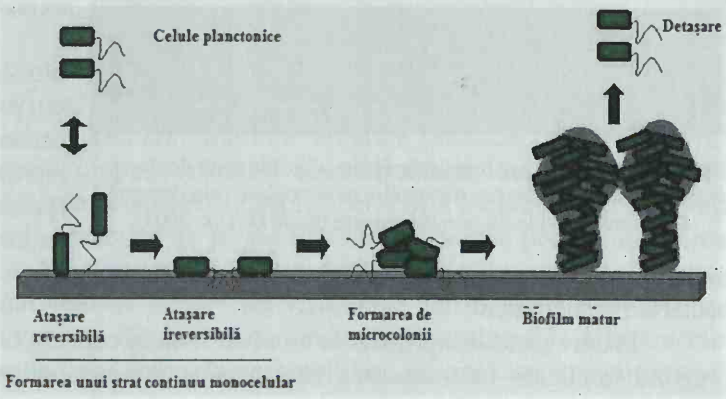


Fig. 38. Diagramă prezentând etapele dezvoltării unui biofilm de *Ps. aeruginosa* 1. Ataşarea iniţială, reversibilă, a celulelor la substrat. 2. Sinteza exopolizaharidelor care determină ataşarea ireversibilă. 3. Formarea microcoloniilor. 4. Maturarea arhitecturii biofilmului. 5. Dispersia celulelor din biofilm (După Caiazza şi colab., 2007, http://www.dartmouth.edu/~gotoole/swarm.html).

Când biofilmul devine suficient de gros, straturile profunde devin anoxice şi conţin predominant specii anaerobe. Mai devreme sau mai târziu, cel puţin celulele de la baza sistemului

devin înfometate şi mor. Anoxia, moartea multor celule şi producerea de gaze pot destabiliza biofilmul, determinând detaşarea şi desprinderea lui de suprafeţele solide. Creşterea poate fi reluată având un caracter ciclic (Zarnea, 1994).

Proprietăţile biofilmelor

Biofilmele bacteriene sunt foarte heterogene în ceea ce priveşte structura, fiziologia, ecologia şi parametrii fizico-chimici.

Arhitectura biofilmelor este heterogenă atât în spaţiu cât şi în timp, schimbându-se constant datorită acţiunii unor factori interni şi externi. Tolker-Nielsen şi colab. au studiat rolul motilităţii celulare asupra arhitecturii biofilmului, examinând interacţiile dintre *Ps. aeruginosa* şi *Ps. putida* prin microscopie confocală de baleiaj cu raze laser. Cocultivarea celor două organisme într-un sistem de creştere continuă, a avut iniţial ca rezultat formarea unor mici microcolonii ale fiecărei specii, însă în timp coloniile au devenit mixte, datorită migrării celulelor de la o microcolonie la alta.

Biofilmele sunt dinamice din punct de vedere funcţional şi răspund la schimbarea condiţiilor mediului. Celulele bacteriene pot fi diseminate din biofilm prin *eliberarea celulelor* rezultate din diviziune, prin *dispersie* datorită gradientului concentraţiei nutrienţilor, procesului de *quorum sensing*, sau prin *diseminare în agregate*, datorită curenţilor de curgere. Agregatele celulare păstrează sensibilitatea scăzută faţă de substanţele antimicrobiene, caracteristică biofilmului. Biofilmele pot de asemenea, să migreze pe suprafeţe prin modalităţi foarte variate (fig. 39, 40).

Fig. 39. Modalităţi de desprindere a celulelor din biofilm (după Costerton şi colab., 1999)

Fig. 40. Modalităţi posibile de deplasare a biofilmelor: deplasare colectivă prin unduire sau rostogolire pe suprafaţă; prin detaşare; deplasare individuală prin diseminare (după Dircks, 2003).

Expresia genică este diferită la bacteriile incluse în biofilm faţă de cele planctonice. Brőzel şi colab. (1995, citaţi de Stoodley, 2002) au evaluat schimbările expresiei genice la celulele ataşate de *Ps. aeruginosa* şi au arătat că în timpul diferitelor etape ale aderenţei, nivelul de expresie a peste 70 de gene s-a modificat.

Sauer şi colab. (2002) au arătat că biofilmele mature de *Ps. aeruginosa* prezintă un profil proteic radical diferit de acela al bacteriilor planctonice crescute în chemostat. Aproximativ 50% din proteomul detectat (peste 800 de proteine) prezintă diferenţe de expresie de şase ori mai mari sau chiar mai mult. Dintre acestea, peste 300 de proteine au fost detectate în eşantioanele de biofilm matur, dar nu la bacteriile planctonice.

Printre genele exprimate la un nivel înalt în celulele biofilmelor mature sunt cele care codifică proteine implicate în traducerea mesagerilor, în metabolism, în transportul membranar şi/sau în secreţie şi reglarea genică.

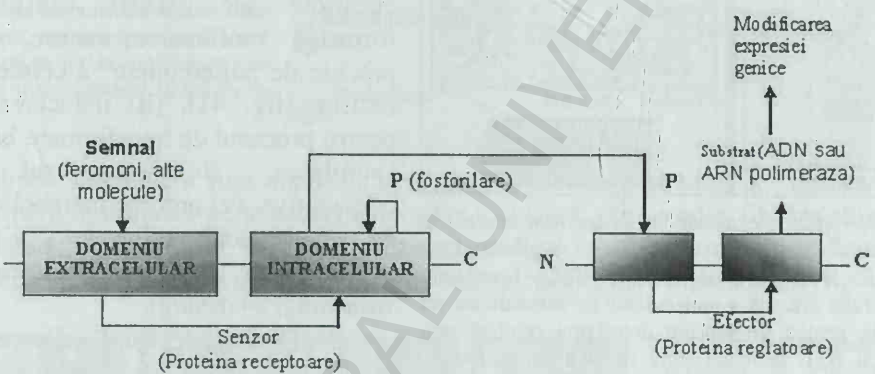
Celulele biofilmului îşi coordonează comportamentul prin molecule de semnalizare destinate „comunicării" intercelulare. Comunicarea intercelulară este un aspect esenţial al convieţuirii într-o

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

comunitate bacteriană şi este mediată prin *semnale chimice* denumite şi „feromoni bacterieni" sau autoinductori. Există dovezi că unele semnale chimice, produse de către celule şi eliminate în mediul extern, pot fi interpretate nu doar de membrii aceleiaşi specii, ci şi de alte specii microbiene şi poate chiar de organisme mai complexe (comunicare inter-regn).

În populaţiile planctonice, semnalele chimice produse de celule nu sunt suficient de concentrate pentru a determina schimbări în expresia genică. Totuşi, în biofilme, matricea care susţine celulele în strânsă proximitate permite acumularea moleculelor de semnalizare în concentraţii suficiente pentru a determina schimbări coordonate în comportamentul celular. Populaţiile bacteriene îşi activează unele gene numai atunci când recepţionează stimulii chimici care semnalează că populaţia lor este destul de numeroasă pentru a fi avantajos şi/sau "sigur" să iniţieze schimbarea unei activităţi genice. De exemplu, unele bacterii patogene nu vor produce toxine până la atingerea unei densităţi adecvate pentru a supravieţui mecanismelor de apărare a gazdei. Modalitatea de recunoaştere a densităţii celulare a unei populaţii prin mecanisme de semnalizare chimică intercelulară a fost denumit *quorum sensing and response* (QS).

QS este un sistem de reglare ubiquitar în lumea bacteriilor, care prezintă două componente implicate în transducţia semnalului: o componentă proteică receptoare (senzor), cu un domeniu extracelular care „recepţionează" semnalele extracelulare şi un domeniu intracelular cu acţiune enzimatică de histidin-kinază, localizată membranar; o componentă proteică reglatoare (efector), localizată în citoplasmă, cu rol activator sau represor al transcrierii genice, prin modificarea conformaţiei specifice a ADN sau prin interacţiune cu ARN- polimeraza.



Fiecare celulă dintr-o populaţie bacteriană produce o anumită cantitate de feromon (autoinductor) care se acumulează pe măsura creşterii densităţii celulare. La atingerea stării de *quorum* bacterian, feromonii (denumiţi în acest caz factori de *quorum*) vor atinge concentraţia prag necesară pentru a interacţiona cu proteine receptoare (senzor). Sub influenţa feromonilor, proteina-senzor se activează printr-un proces de autofosforilare. Proteina efectoare activată prin fosforilarea domeniului aminoterminal va interacţiona direct cu ADN bacterian, modulând activitatea anumitor gene.

Cel mai studiat sistem de comunicare interbacteriană, prin intermediul feromonilor, este sistemul homoserin-lactonelor (HL) şi al derivaţilor lor, funcţional la bacteriile Gram negative.

Sistemele QS, la bacteriile Gram- pozitive, implică semnale chimice diferite de HL. Unele specii de *Streptomyces* sintetizează compuşi difuzibili similari autoinductorilor, denumiţi generic, *butanolide*, care intervin în reglarea producerii antibioticelor şi a metaboliţilor generaţi în faza staţionară. Cel puţin două peptide secretate de *B. subtilis* sunt necesare pentru inducerea stării de competenţă şi sporulare. La *S. aureus* un singur octapeptid este suficient pentru declanşarea expresiei coordonate a mai multor factori de virulenţă. Feromonii oligopeptidici sunt necesari şi pentru transferul conjugativ la *Enterococcus faecalis*. Sporularea la *Myxococcus xanthus* necesită, de asemenea, integrarea unor semnale extracelulare, dintre care cel puţin unul este constituit din aminoacizi.

Primul sistem QS a fost evidenţiat la bacteriile luminiscente (*Vibrio fischeri, Vibrio harveyi, Photobacterium* sp.) care trăiesc în simbioză în organele luminoase ale unor specii de peşti marini de

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

mare adâncime şi ale diferitelor specii de moluşte. Aceste bacterii produc lumină (prin activarea genelor ce codifică luciferaza) numai în stare simbiotică. În stare liberă, când densitatea bacteriană este scăzută, bacteriile nu produc luciferază. Aceleaşi bacterii, cultivate în condiţii de laborator, la atingerea unei densităţi critice, îşi activează genele pentru luciferază, consecinţa fiind creşterea bruscă de circa 100 de ori a cantităţii de lumină eliberate de fiecare celulă. Prin adăugarea la o cultură bacteriană cu densitate mică a unui supernatant de cultură bacteriană cu densitate mare, celulele şi-au activat genele pentru luciferază, demonstrându-se astfel reglarea acestui proces fiziologic prin intermediul unui factor solubil (feromon) ce se acumulează în mediul de cultură pe măsura creşterii densităţii culturii bacteriene. Aceste observaţii explică de ce bacteriile luminescente nu pot produce lumină atunci când trăiesc în stare liberă şi la densităţi scăzute în mediul marin. În schimb, în condiţiile simbiozei cu organele luminoase ale organismelor superioare, aceleaşi specii bacteriene supuse unor condiţii favorabile de creştere şi în acelaşi timp, unei restricţii spaţiale, pot atinge densităţi celulare mult mai mari, necesare inducţiei feromonilor bacterieni.

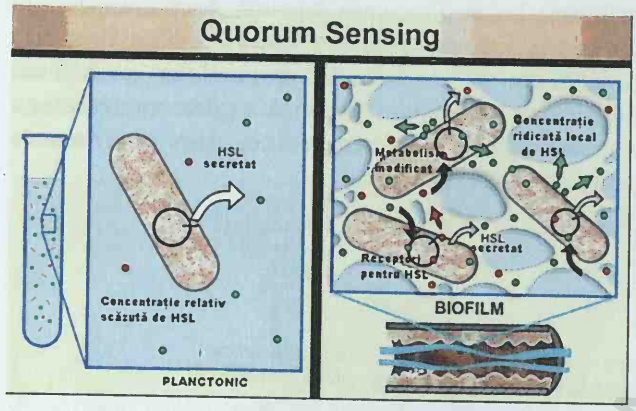


Fig. 41. Ilustrarea rolului mecanismului de *quorum sensing* în formarea biofilmului de către o specie Gram negativă. Deşi celulele planctonice secretă semnale chimice (HSL – homoserin lactone), concentraţia scăzută a moleculelor de semnalizare nu modifică expresia genică. În biofilm densitatea celulară este mare, astfel încât HSL secretate ating concentraţii mai mari. Moleculele HSL sunt recepţionate de celulele din biofilm şi determină schimbări în activitatea genetică a celulei (după Costerton şi Dircks, 2004).

Rolul feromonilor nu se limitează numai la controlul bioluminiscenţei, ci şi al altor procese fiziologice extrem de variate: (i) expresia coordonată a anumitor factori de virulenţă de către bacteriile patogene sau oportuniste ca răspuns la contactul cu celulele eucariote ale gazdei sensibile, inclusiv formarea biofilmelor mature, care implică procese de „diferenţiere" a celulelor incluse în biofilm (fig. 41), (ii) inducerea competenţei pentru procesul de transformare bacteriană, (iii) sporularea, (iv) transferul plasmidelor conjugative, (v) procese metabolice dependente de densitatea celulară, (vi) biosinteza antibioticelor, (vii) motilitatea (*twitching, swarming, swirming*).

Deoarece unul dintre cele mai importante roluri ale mecanismelor de QS, atât la bacteriile Gram negative, cât şi la cele Gram pozitive, este reprezentat de reglarea expresiei coordonate a factorilor de virulenţă şi evitarea mecanismelor de apărare antiinfecţioase ale gazdei, în prezent aceste mecanisme reprezintă ţinta dezvoltării unor noi strategii anti-patogenice, bazate pe blocarea mecanismelor de semnalizare intercelulară la diferite niveluri (blocarea sintezei moleculelor de semnalizare prin administrarea unor analogi ai acestora, inhibarea propagării semnalului mediat de feromoni prin diminuarea concentraţiei extracelulare a acestora, inhibarea recepţionării semnalelor prin utilizarea unor molecule competitive (cu structură asemănătoare feromonilor bacterieni) sau necompetitive (cu structură chimică diferită) capabile să interfere cu legarea moleculelor de semnalizare la proteina senzor sau cu transmiterea semnalului la proteina reglatoare.

Una dintre cele mai importante consecinţe ale formării biofilmelor este rezistenţa crescută a celulelor incluse în biofilm, atât la mecanismele de apărare ale gazdei, cât şi la dozele convenţionale de antibiotice şi biocizi, celulele manifestând proprietatea de rezistenţă faţă de substanţele antimicrobiene. Mecanismul protecţiei sau rezistenţei la factorii antimicrobieni, pentru care termenul mai corect ar fi *toleranţă* sau *rezistenţă fenotipică* (foarte diferită de rezistenţa propriu-zisă la antibiotice, determinată genetic) este subiectul unor dezbateri curente.

Au fost emise mai multe ipoteze, care au formulat factorii determinanţi ai rezistenţei comportamentale, diferiţi de factorii genetici de rezistenţă (fig. 42):

- aderența la substrat și agregarea bacteriilor între ele;
- exopolimerii secretați care protejează celulele; această ipoteză, formulată adesea în trecut, conform căreia structura mucoidă ar constitui o barieră de difuzie față de moleculele antimicrobiene, este respinsă azi de unii autori;
- enzimele degradative, fie provenind de la o singură specie și acumulate în concentrații mari, fie, provenind de la specii diferite și acționând sinergic;
- aderența celulară însăși determină modificări fiziologice (intrarea în stare de latență metabolică a celulelor din straturile profunde ale biofilmului, subexprimarea porinelor, supraexprimarea pompelor de eflux)

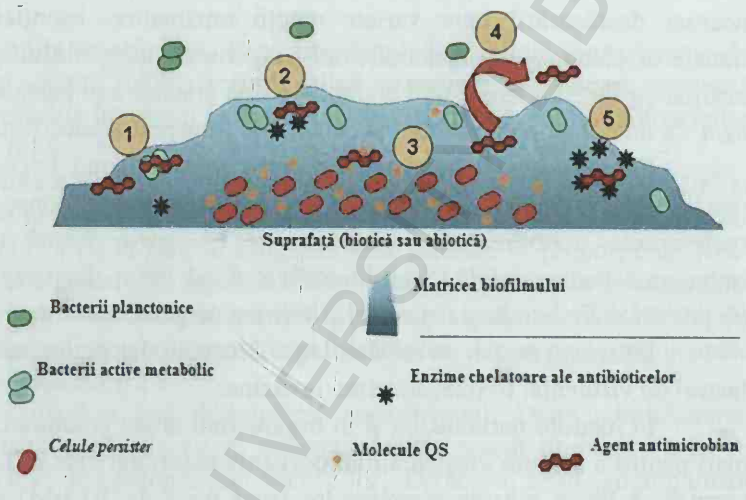


Fig. 42. Mecanismele rezistenței biofilmelor la antibiotice: 1) permeabilitatea redusă a matricei biofilmului pentru antibiotice, care acționează doar la nivelul straturilor superficiale; 2) activitate redusă a antibioticelor datorită condițiilor locale (reziduuri microbiene, pH, pCO_2, pO_2 etc); 3) distrugerea antibioticului de către enzimele inactivatoare acumulate în interiorul biofilmului; rata de creștere redusă a celulelor din biofilm (populație *persister*); 4) eliminarea activă a antibioticului prin intermediul pompelor de eflux exprimate de celulele crescute în biofilm; 5) activarea răspunsului la stres care se manifestă prin supra-exprimarea unor mecanisme de rezistență la antibiotice (de exemplu, enzime inactivatoare) (după Pozo și Patel, 2007).

Biofilmele microbiene sunt implicate în generarea infecțiilor cronice, persistente, greu de tratat, consecutiv formării biofilmelor pe țesuturi (endocadita valvulară, otita medie, fibroza chistică, prostatita bacteriană cronică, periodontita) sau pe dispozitive medicale (valve cardiace artificiale (protetice), catetere centrale venoase, catetere urinare, lentile de contact, dispozitive intrauterine) (fig. 43).

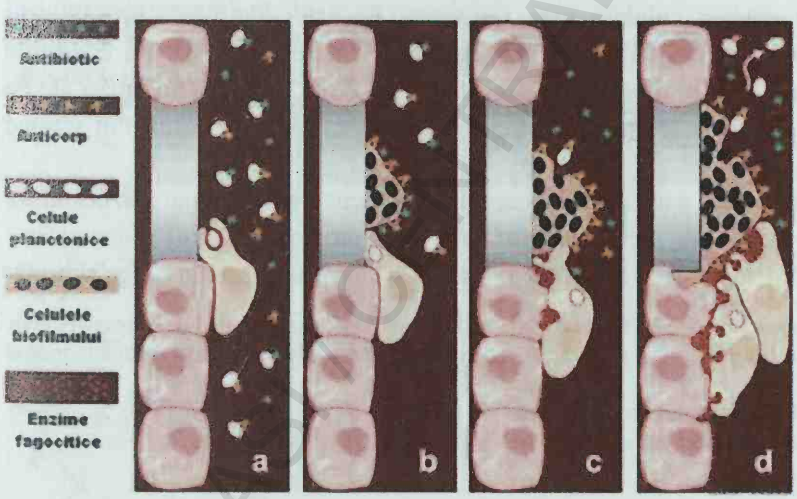


Fig. 43. Interacțiunea unui biofilm microbian cu efectorii imunitari ai gazdei. Bacteriile planctonice pot fi eliminate de anticorpi și fagocite și sunt sensibile la antibiotice. b. Celulele bacteriene aderate formează biofilme, preferențial pe suprafețe inerte. Comunitățile sesile sunt rezistente la anticorpi, fagocite și antibiotice. c. Fagocitele sunt atrase de biofilme. Biofilmul nu poate fi fagocitat, dar fagocitele își eli-berează enzimele lizosomale în mediul extracelular. d. Enzimele fagocitelor lezează țesutul din jurul biofilmului și celulele planctonice sunt eliberate din biofilm. Eliberarea lor poate determina diseminarea și infecția acută în țesutul învecinat (după Costerton et al., 1999).

4.3. Sideroforii –factori de virulență

Fierul, deși este al IV-lea metal al planetei din punct de vedere cantitativ, se găsește majoritar sub forma hidroxizilor insolubili. Fe este substanța minerală esențială pentru toate celulele eucariote și procariote, dar este toxic în concentrație mare. În cele mai multe habitate Fe^{2+} este instabil, fiind oxidat la Fe^{3+}, fie spontan prin reacția cu O_2 molecular, fie pe cale enzimatică, în reacțiile metabolice. În mediile naturale, în prezența O_2 și a H_2O, la pH neutru și alcalin, Fe^{3+} formează oxidul feric hidratat

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI
BIO.CGIE

(Fe_2O_3. nH_2O) sau este legat de *agenți chelatori* (compuși chimici în care un ion metalic multivalent este captat, sechestrat și legat în structura ciclică a agentului chelator). În organismul uman și animal, Fe este legat stabil de diferite proteine: hemoproteinele (hemoglobina, mioglobina) leagă circa 2/3 din cantitatea totală de Fe, în hem.

Multiplicarea bacteriilor în țesuturile gazdei este limitată de mecanismele de apărare ale gazdei și este condiționată de capacitatea de a-și obține nutrienții. Bacteriile necesită prezența obligatorie a Fe^{2+} (forma accesibilă metabolismului), cu excepția lactobacililor. Fe^{2+} se găsește în structura chimică a tuturor tipurilor de celule.

Fe este un component al moleculelor esențiale (citocromi, ribonucleotid-reductaza etc.), fiind necesar desfășurării unor variate reacții enzimatice, esențiale pentru creștere: replicarea ADN, transferul electronilor, metabolismul oxigenului, peroxidului și radicalului superoxid (SOD este o enzimă cu Fe); Fe^{2+} este un cofactor de sine stătător sau parte a unui grup prostetic, în special de tip *hem,* ca un component esențial al catenei de transport al electronilor în membrana celulară.

Fierul poate fi defavorabil pentru metabolismul bacterian: radicalii liberi $OH^{\cdot}$ generați în reacțiile Haber-Weiss, catalizate de Fe, se pot acumula, consecința fiind moartea celulei. De aceea, sechestrarea, mobilizarea și depozitarea Fe într-o formă netoxică, biodisponibilă, este foarte importantă pentru celulă. S-au identificat două tipuri de proteine de depozit al Fe: *bacterioferitina* (depozitează Fe hemic și nehemic) și feritina (depozitează numai Fe nehemic).

Fe are nu numai un rol fiziologic deosebit, dar multe bacterii îl utilizează pentru activarea unor factori de virulență: toxine, adezine, invazine.

În mediile naturale, ca și în organismul uman și animal, Fe se găsește în cantități suficient de mari pentru a asigura creșterea microorganismelor, dar este în forme inaccesibile. Astfel, concentrația normală a Fe în plasma mamiferelor (mai mică de 10 μM) este satisfăcătoare pentru creșterea și multiplicarea bacteriilor, dar numeroși factori îl fac inaccesibil microorganismelor. Practic, Fe disponibil lipsește, deoarece este chelat de proteine care-l leagă cu mare afinitate sau este component al eritrocitelor. Un deficit parțial al Fe are efect bacteriostatic, iar deficitul major are efecte letale, prin inhibiția sintezei proteinelor. Fe anorganic este insolubil în aerobioză la pH fiziologic.

De aceea, sinteza componentelor celulare care utilizează Fe este controlată prin diferiți parametri, care acționează în diferite condiții fiziologice și de mediu, în sens negativ (în condițiile excesului de Fe în mediu) sau în sens pozitiv (în condițiile limitante ale Fe). Concentrațiile mari ale Fe duc la stoparea expresiei multor gene implicate în înglobare. În condițiile limitării Fe, intră în acțiune mecanismele reglatoare pozitive.

În organismul uman și animal, Fe este legat în complexe organice cu *proteine intracelulare* (feritina, hemosiderina, gruparea hem din hemoglobină sau din mioglobină), cu *glicoproteine extracelulare* (lactoferina din secreții – lapte, salivă, lacrimi), precum și cu *transferina* din sânge și limfă.

* Cea mai mare parte a transferinei se sintetizează în ficat și este eliberată în fluidele organismului. Ea leagă Fe feric la locul absorbției și-l transportă la locul utilizării. Celulele mamaliene reglează concentrația Fe intracelular, prin intermediul a două proteine:

- o proteină de import al Fe, cu rol de *receptor de transferină;*
- proteină de depozit al Fe, reprezentată de *feritina.*

Transferina pătrunde în celulă prin intermediul receptorului membranar specific. După ce celula importă transferina, Fe este încorporat în proteinele celulare (citocromi etc.), iar excesul este depozitat ca feritină. Când celula necesită o cantitate mai mare de Fe, crește densitatea receptorului de transferină și astfel celula preia o cantitate mai mare de Fe din mediul extracelular și reduce concentrația de feritină.

Dacă Fe se acumulează în exces în celulă, scade densitatea receptorilor de transferină și crește cantitatea de feritină.

În plasmă, hemoglobina (Hbg) este complexată cu alte proteine ca haptoglobina*, iar cantități mici de hem pot fi legate de albumină sau de hemopexină. Fierul intracelular poate fi asociat cu Hbg, transferina sau cu lactoferina sau este depozitat sub forma feritinei.

**Haptoglobina* este o proteină din setul reactanților de fază acută. Se sintetizează în ficat și are rolul de a îndepărta hemoglobina liberă, rezultată prin hemoliza intravasculară. Se formează un complex stabil, ireversibil, care este epurat rapid de hepatocite. După leziunea tisulară, haptoglobina crește de 2–4 ori și se găsește în exsudatul inflamator. Nivelul scăzut de haptoglobină are semnificație clinică după vârsta de un an și se poate datora insuficienței hepatice, dar la majoritatea pacienților, cauza este hemoliza intravasculară și rata rapidă de *clearance* a complexelor haptoglobină-hemoglobină. Nu există o corelare cantitativă între nivelul haptoglobinei plasmatice și amploarea hemolizei, deoarece chiar o hemoliză minoră diminuează masiv cantitatea de haptoglobină. Dacă pacientul este în faza acută a unui proces infecțios sau inflamator de altă natură, nivelul "normal" al haptoglobinei nu exclude diagnosticul de hemoliză.

Lactoferina face parte din familia transferinei. Este sintetizată de celulele fagocitare și de hepatocite. În stare liberă se găsește în secreții (lapte, lacrimi, salivă, secreția mucoasă care tapetează epiteliile). Neutrofilele eliberează lactoferina în situsul inflamator. Identitatea secvenței aminoacizilor dintre lactoferină și transferină este de 60%.

Proteinele care leagă Fe au afinitate înaltă, au constante înalte de legare, de aproximativ 10^{36} și în mod normal sunt parțial saturate. De exemplu, *feritina* leagă circa 4500 atomi de Fe^{3+}/moleculă, iar *transferina**, proteina majoră de transport a Fe în plasma sanguină, este saturată în proporție de 30%.

Transferina și lactoferina conțin 2 situsuri de legare a Fe/moleculă. Homeostazia Fe controlată riguros, are ca rezultat o concentrație scăzută a Fe biodisponibil liber în plasmă, de circa 10^{-24}M, de câteva ori mai mic decât nivelul necesar creșterii normale a bacteriilor. De aceea, organismele patogene sunt strict limitate în privința dobândirii Fe.

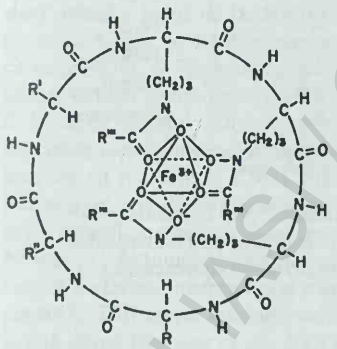
Rolul Fe în patogeneza infecțioasă a fost demonstrat experimental. După administrarea parenterală a Fe la cobai, sensibilitatea la infecția cu *K. pneumoniae* a crescut dramatic, ceea ce demonstrează rolul aprovizionării cu Fe asupra patogenezei bacteriilor. De aceea, serul sanguin uman este bacteriostatic.

În timpul evoluției, cantitatea restrictivă de Fe disponibil a creat mecanisme specializate pentru utilizarea resurselor de Fe, prin contact direct sau indirect. Bacteriile și-au elaborat mecanisme adaptative prin care mobilizează Fe și îl disponibilizează pentru activitățile celulei. Bacteriile preiau Fe din transferină, lactoferină, hemoglobină și din complexele hemoglobină-haptoglobină, iar cele cu localizare intracelulară, din rezerva celulei.

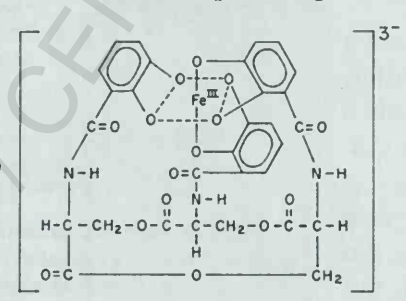
L. monocytogenes produce o reductază a Fe^{3+} la Fe^{2+} și astfel Fe este eliberat din glicoproteinele chelatoare intracelulare.

Se recunosc două mecanisme prin care bacteriile dobândesc Fe:

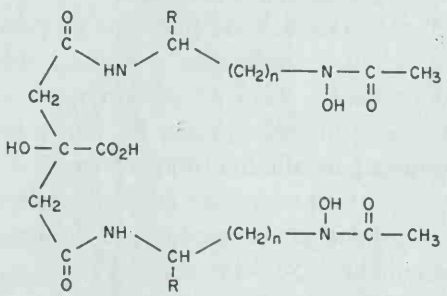
- mecanismul preluării indirecte prin intermediul sideroforilor;
- mecanismul preluării directe a Fe prin receptorii celulari care leagă proteinele cu Fe.



Structura ferocromului, exemplul tipic al unui siderofor de tip hidroxamat. $R = R' = R'' = H$; $R''' = CH_3$ (Neilands, 1995).



Structura enterobactinei ferice, exemplul tipic al unui siderofor de tip catechol (cele 3 inele catechol asigură legarea coordinativă a Fe) (Neilands, 1995).



Structura aerobactinei, exemplu tipic al unui siderofor de tip citrat-hidroxamat (Neilands, 1995).

Sideroforii sunt agenți chelatori sintetizați și secretați de microorganismele procariote și eucariote (și chiar de plantele superioare), care intră în competiție pentru legarea Fe, cu proteinele

gazdei care sechestrează Fe. Denumirea generală a agenților chelatori bacterieni este cea de *siderofori*. Sideroforii sunt molecule mici (600 Da), difuzibile, secretate de multe microorganisme, în condițiile scăderii concentrației de Fe biodisponibil, care au în structura lor, grupări caracteristice de tipul *catechol, fenolat* sau *hidroxamat*. Structura moleculară caracteristică, definită funcțional ca o "cușcă moleculară", are rolul de *a lega* Fe^{3+} (feric) din mediul extracelular. Sideroforii sunt secretați prin pompele de eflux ale suprafamiliei MFS (*major facilitator superfamily*).

Sinteza sideroforilor este catalizată de sintetaze neribosomale, un complex multienzimatic care activează și asamblează un spectru larg de aminoacizi, ceea ce are ca rezultat diversitatea structurală înaltă a peptidelor macrociclice.

Sideroforii secretați formează complexe stabile cu Fe^{3+} extracelular.

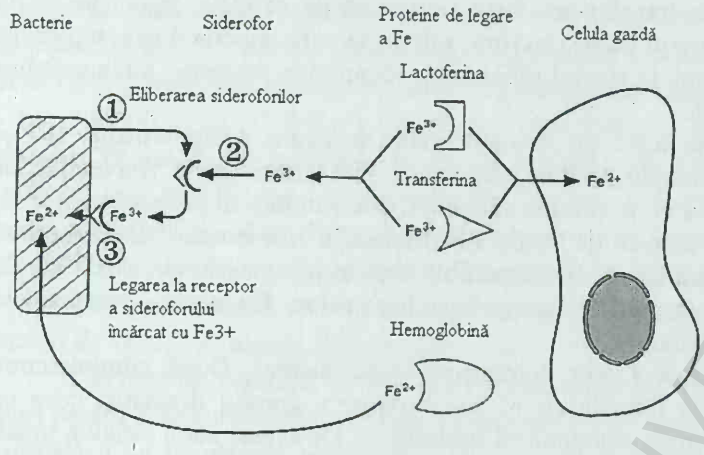


Fig. 44a. Mecanismul preluării Fe de către siderofori (Baron, 1996).

Ulterior, complexul siderofor – Fe^{3+} este recunoscut de un receptor situat în membrana externă, dar nu poate trece prin canalele membranei celulei bacteriene datorită dimensiunilor sale. Transferul membranar al Fe^{3+} mediat de receptor, este asociat cu reducerea lui la forma feroasă (Fe^{2+}), iar sideroforul rămâne la nivelul receptorului (fig. 44 a, b). La bacteriile Gram pozitive, complexele Fe-siderofor sunt recunoscute selectiv de receptori membranari și transportate în celulă cu consumul ATP. În celulă, complexul Fe-siderofor se disociază prin hidroliza sideroforului și/reducerea ionului feric la Fe^{2+} (feros), care este depozitat în bacterioferitină, utilizată ca un cofactor în câteva procese celulare vitale. Fe este legat în centrul sideroforilor cu o afinitate echivalentă celei de legare cu transferina.

Sideroforii se găsesc nu numai la bacteriile patogene, ci constituie mecanisme eficiente de preluare a Fe în tot regnul procariotelor. În funcție de specie, ei sunt factori cu diferite grade de virulență. Sideroforii pot prelua ionii de Fe chiar din compuși minerali, ca hematita.

O modalitate frecventă de preluare a Fe este utilizarea xenosideroforilor, funcțională la *S. cerevisiae,* adică microorganismele preiau Fe din sideroforii sintetizați de alte microorganisme.

Fe intracelular poate fi obținut prin liza celulei gazdă, mediată de citolizine sau hemolizine. Se eliberează Fe, hemul sau Hbg. Unele bacterii folosesc Fe din celulele care degenerează la suprafața epiteliilor mucoase.

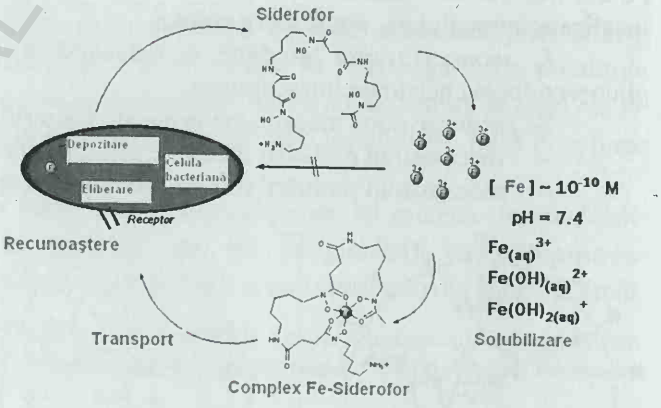


Fig. 44b. Ilustrarea mecanismului prin care sideroforii funcționează ca mediatori ai cantității de Fe disponibil (//www.chem.duke.edu/~alc/labgroup/research).

S-a constatat că genele pentru aerobactin la *Shigella sp.* sunt represate *in vivo,* în interiorul macrofagelor. Totuși, unele bacterii intracelulare secretă molecule *siderofor-like* capabile să penetreze vacuola, să se încarce cu Fe din citoplasmă și să se întoarcă în vacuolă. Vacuolele parazitare pot fuziona cu vezicule de exocitoză sau endocitoză care conțin Fe și îl utilizează. Unii paraziți (*Toxoplasma*) pot induce formarea porilor în membrana vacuolară, permițând moleculelor gazdei (care transportă Fe) să pătrundă în interiorul vacuolei.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Speciile de *Neisseria* şi *Prevotella (Bacteroides)* elimină proteaze specifice care degradează transferina şi eliberează Fe.

Mecanismele *directe* de preluare a Fe constau în înglobarea surselor de Fe (lactoferina, transferina, feritina, hemul şi/sau hemoproteinele). Dezavantajul este că mecanismele directe necesită existenţa receptorilor specifici pentru fiecare sursă de Fe, iar structura chimică a surselor este diferită de la un compartiment la altul al gazdei. Mecanismul de preluare directă a Fe este propriu unor bacterii patogene care colonizează mucoasele (*Neisseria sp., Bordetella sp., H. influenzae, M. catarrhalis, Actinobacillus pleuropneumoniae*). Ele nu secretă siderofori, dar preiau Fe prin contactul selectiv între componentele membranei externe, cu proteinele care leagă Fe (transferina, lactoferina sau chiar hemoglobina). *Neisseria* sp. şi *H. influenzae* utilizează ca surse de Fe numai transferina şi lactoferina umană, ceea ce ar explica specificitatea lor pentru gazdele primate.

Receptorul pentru hemoglobină de la *N. gonorrhoeae* leagă preferenţial, dar nu exclusiv, hemoglobina umană, scoate hemul şi-l transferă în spaţiul periplasmic. Printr-un mecanism necunoscut, este internalizat numai hemul, iar hemoglobina rămâne la exterior. În citoplasmă, unele bacterii au enzime omologe oxigenazei hemice umane, care degradează hemul la α-biliverdină, cu eliberarea Fe şi CO*.

* Toxicitatea CO pentru om se atribuie afinităţii înalte pentru toate proteinele ce conţin Fe hemic, scăzând capacitatea hemoglobinei de a lega O_2. CO este inhibitor al enzimelor cu Fe nehemic, inclusiv hidrogenaza şi nitrogenaza. Mamiferele produc CO endogen prin degradarea hemului. Hbg discriminează între CO endogen şi exogen. Fără discriminare, CO de origine endogenă s-ar lega cu 20% din proteinele cu hem din organism.

4.4. Agresivitatea (Invazivitatea)

Puterea de invazie (agresivitatea sau invazivitatea) reprezintă capacitatea agenţilor patogeni de a depăşi prin mecanisme specifice, barierele epiteliale, de a pătrunde în ţesuturile gazdei şi de a se multiplica, producând efecte patologice. Microorganismele invazive au capacitatea de a pătrunde prin mijloace proprii în ţesuturile gazdei sau de a stimula funcţia endocitară a substratului şi de a-şi păstra viabilitatea în mediul gazdei (fig. 45).

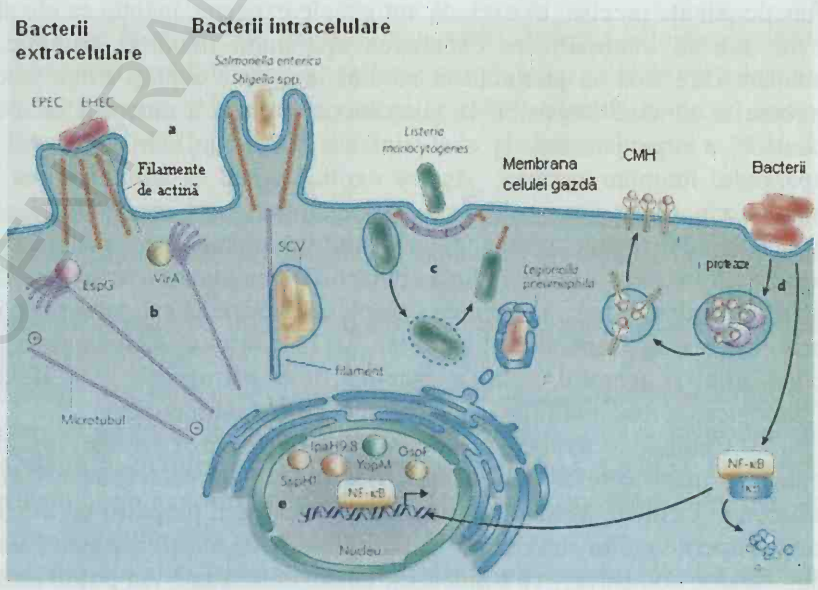


Fig. 45. Biologia celulară a procesului infecţios indus de bacterii extra- şi intracelulare. a, b. Reorganizarea citoscheletului; c. Pătrunderea în citoplasma celulei gazdă prin endocitoză; d. Evitarea mecanismelor de apărare prin prezentarea antigenelor bacteriene asociate cu moleculele CMH, modificarea expresiei genelor pentru molecule proinflamatorii (de exemplu, NF-kB); e. Acţiunea directă a moleculelor bacteriene injectate prin mecanismul SST III asupra nucleului celulei gazdă (după Bhavsar et al., 2007).

Invazia este modalitatea prin care microorganismele infecţioase sparg barierele epiteliale ale gazdei. Multe bacterii patogene au capacitatea de a supravieţui în interiorul celulei eucariote. Ele pătrund în celule care în mod obişnuit nu sunt fagocitare (celulele mucoase, celulele endoteliale ale vaselor sanguine). Mediul intracelular oferă protecţie microorganismului, care ori se multiplică ori persistă.

BUCUREŞTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În general, organismele invazive aderă la celula gazdă prin intermediul unei clase de molecule de adezine, denumite *invazine*, care orientează intrarea bacteriei în celulă. Mecanismele de aderență declanşează sau stimulează semnalele celulare, care direct sau indirect uşurează intrarea bacteriei. Invazia este un eveniment activ, susținut de funcțiile normale ale celulei. Suportul procesului de invazie şi înglobare este citoscheletul celulei gazdă.

Puține specii bacteriene sunt capabile să forțeze intrarea directă în celula gazdă, printr-o digestie enzimatică locală a membranei celulei gazdă, după aderență. De exemplu, *R. prowazecki* secretă fosfolipaze care produc degradarea localizată şi controlată a membranei celulei gazdă. Prin leziunile membranare, agentul patogen intră direct în citoplasmă.

În categoria *invazinelor* intră o categorie de proteine asociate suprafeței celulare, dar şi apendicele celulare evidențiate la microscopul electronic (fimbrii şi flageli) sau cele care constituie un strat fin, înalt organizat, pe suprafața celulei. Invazinele uşurează răspândirea bacteriilor în organism, după fixarea şi multiplicarea lor la poarta de intrare.

Flagelii ca organite de motilitate sunt în acelaşi timp invazine, deoarece conferă un avantaj evident celulelor bacteriene care trebuie să traverseze stratul vâscos de mucus, pentru a ajunge la celulele epiteliale ale tractului digestiv sau respirator.

Fimbriile, la bacteriile patogene, au rol de adezine bacteriene, dar în aceiaşi măsură ele constituie şi un factor de agresivitate, deoarece conferă un grad de protecție a celulei față de factorii de apărare ai gazdei.

Unele invazine produc efect *necrotic* sau determină alte modificări care favorizează colonizarea tisulară progresivă. De exemplu, unele bacterii produc *hialuronidaza* şi alte enzime care hidrolizează polimerii din substanța fundamentală a țesutului conjunctiv, favorizând astfel invadarea vaselor sanguine şi limfatice.

Agenții patogeni au elaborat strategii care le permit să invadeze suprafețele mucoase. Aderența selectivă de celulele M este o modalitate eficientă de invazie. Bacteriile şi virusurile care utilizează calea de transport a celulelor M, pot infecta mucoasa digestivă şi se pot disemina sistemic.

Celulele M (*M*icrofold), care acoperă plăcile Peyer reprezintă o specializare locală a epiteliului intestinal. Ele separă foliculii limfoizi asociați epiteliului, de lumenul intestinal. Plăcile Peyer, formate din foliculi limfoizi agregați, sunt componenta majoră a sistemului imunitar al mucoaselor şi au o funcționalitate precisă: să excludă antigenele exogene, înainte ca ele să pătrundă în mediul intern şi să evite sau să minimalizeze expunerea aparatului imunitar sistemic, la antigenele moleculare sau celulare care tind să pătrundă în mediul intern. În acelaşi timp, țesutul limfoid asociat mucoaselor trebuie să rămână insensibil la microbiota normală a mucoaselor. MALT are calitatea de "zonă de control" a organismului, la contactul cu antigenele, dar are şi rol reglator asupra funcționalității aparatului imunitar sistemic. Aşa se explică faptul că administrarea orală a unui antigen la om sau animale, în esență, nu produce un răspuns imun sistemic, ci de obicei, un răspuns imun al mucoasei. Mecanismul nu este cunoscut, dar sistemul imunitar al mucoaselor împiedică răspunsul imun amplu al aparatului imunitar sistemic, după contactul cu un număr foarte mare de antigene intestinale, în special de origine alimentară. Antigenele complexe bacteriene sau virale pot iniția un răspuns imun complex, prin intermediul aparatului imunitar al mucoaselor. Deficiențele funcționale ale MALT expun organismul şi aparatul imunitar sistemic, unei permanente stări de activare, care depăşeşte limitele fiziologice, consecința fiind instalarea maladiilor autoimune.

Celulele M acoperă plăcile Peyer şi pinocitează material luminal sub formă solubilă, pe care îl transferă macrofagelor subiacente. Macrofagele prelucrează antigenele şi le prezintă limfocitelor adiacente. Celulele M sunt considerate ca un sistem timpuriu de avertizare a sistemului imunitar. Ele sunt acoperite cu un strat mucos subțire, microvili scurți, dar sunt foarte active din punct de vedere al pinocitozei, comparativ cu celulele epiteliale columnare. Au puțini lizosomi şi materialele înglobate nu sunt supuse degradării. Deşi celulele M au evoluat ca un sistem protector strategic, proprietățile lor funcționale le conferă calitatea unor adevărate porți de intrare – un călcâi al lui Achile al intestinului, deoarece bacteriile patogene dobândesc acces spre structurile profunde.

Celulele M transportă macromolecule, particule şi microorganisme, direct în mediul celular al foliculilor limfoizi ai mucoasei. Ele nu au receptori pentru imunoglobulinele polimerice, adică nu transferă IgA, ceea ce favorizează accesul antigenelor la suprafața mucoasei. Prin epiteliul folicular,

microorganismele dobândesc acces la structurile limfoide ale foliculului. Consecința este benefică, deoarece, astfel se inițiază răspunsul imun protector față de microorganismele luminale. Din acest punct de vedere, celulele M formează un sistem de avertizare timpurie.

Celulele M ale foliculilor sunt specializate pentru transportul transepitelial. Suprafața bazolaterală a celulelor M este intruzată profund, formând un "buzunar" mare, intraepitelial, în care sunt eliberate particulele şi macromoleculele transportate. Celulele M au prelungiri bazale de circa 10 μm, ce se extind în țesutul limfoid subiacent şi stabilesc contacte directe cu celulele limfoide sau cu celulele prezentatoare de antigen. Celulele din pliul membranar al celulei M sunt limfocite T CD_4 cu receptor de tip αβ, limfocite B şi un număr mic de macrofage. Puține limfocite T sunt de memorie sau neangajate (naive). Pliul celulei M este situsul interacțiunii celulelor T, cu celulele ce prezintă antigenul (limfocite B şi macrofage).

Macrofagele şi celulele dendritice au probabil rolul de a îngloba agenții patogeni transportați de celulele M, de a prelucra şi depozita antigenele.

Interacțiunea agenților patogeni cu celula M variază larg, de la transportul simplu, până la distrugerea celulelor epiteliale foliculare. Virusurile care aderă de celulele M declanşează procesul de endocitoză, iar bacteriile modifică enzimatic suprafața celulelor epiteliale M, induc semnalul declanşator al internalizării şi alterează bariera epitelială.

Pătrunderea virusurilor prin celulele M

Celulele M preiau virionii aderați şi macromoleculele prin mecanismul endocitozei, pe calea veziculelor tapetate cu clatrină. Materialele neaderente sunt preluate prin endocitoză în faza fluidă, în vezicule tapetate sau netapetate cu clatrină. Particulele mari aderente şi bacteriile stimulează procesul de endocitoză, mediat de extensia prelungirilor celulare şi reorganizarea filamentelor de actină ale citoscheletului. Nu este cunoscut dacă celulele M participă la prelucrarea şi prezentarea antigenelor.

Enterovirusurile pătrund în organism pe cale orală. Poliovirusul de tip I şi tulpina Sabin atenuată aderă selectiv la celulele M şi se multiplică în plăcile Peyer, înainte de a se disemina sistemic. Deoarece poliovirusul depăşeşte bariera intestinală prin celula M, îi conferă calitatea de vector al unor vaccinuri orale.

Transmiterea sexuală a HIV se face pe cale vaginală sau anală. Infecția este facilitată de leziunile epiteliale, dar HIV poate traversa epiteliile simple şi stratificate. *In vivo*, celulele epiteliale ale rectului se pot infecta, dar dovezile nu sunt concludente pentru epiteliul vaginal. În rectul uman, foliculii limfoizi sunt acoperiți de celule M. Celulele M rămân o cale posibilă de acces a HIV, la celulele limfoide subiacente.

Pătrunderea microorganismelor la nivelul epiteliului folicular are şi consecințe nefavorabile, deoarece acesta poate fi o cale de acces a microorganismelor patogene (*S. typhi*), la structurile submucoase.

Enterobacteriile au mecanisme proprii de invazie. Agenții patogeni enterici străpung bariera mucoasei intestinului subtire, prin motilitate flagelară, la nivelul celulelor *M*.

Aderența bacteriilor la celulele eucariote necesită recunoaşterea oligozaharidelor specifice ale glicoproteinelor. Faptul este evidențiat de rezultatele experimentale *in vitro*: oligozaharidele sunt cei mai puternici inhibitori ai interacțiunii bacteriilor cu suprafața celulei eucariote. Celulele bacteriene interacționează cu celulele M, probabil, prin intermediul glucidelor. Celulele M posedă o diversitate de glicoconjugate, care modulează capacitatea lor de a prelua microorganismele.

Tulpinile de *E. coli* nepatogene din intestin nu aderă selectiv la celulele epiteliale, dar anumite tulpini patogene colonizează mucoasa şi interacționează cu celulele M. Aderența la celulele epiteliului intestinal şi la celulele M induce dezagregarea microvililor şi respectiv a pliurilor celulelor M, odată cu formarea la situsurile de aderență a unor structuri speciale, denumite *piedestale* – consecință a reorganizării filamentelor de actină.

V. cholerae interacționează strâns cu zone extinse ale membranei apicale ale celulei M. Semnalul activator induce reorganizarea actinei submembranare şi celula bacteriană este fagocitată

fără lezarea celulei M. Înglobarea de către celulele M nu produce maladia. Agentul patogen nu supraviețuiește în mucoasă și nu se diseminează sistemic.

Înglobarea vibrionilor de către celulele M activează un răspuns imun protector al mucoasei: secreția de sIgA anti-toxină și anti-LPS, care pot preveni colonizarea mucoasei cu *V. cholerae* și implicit maladia diareică.

În intestinul subțire, *V. cholerae* exprimă un grup de adezine proteice prin intermediul cărora aderă de enterocite. Pilii stabilizează coloniile pe suprafața mucoasei, iar toxina holerică induce secreția ionilor de clor, din celulele intestinale în lumen.

Ingestia celulelor de *Salmonella* induce formarea focarelor de infecție în plăcile Peyer. *S. typhi* și *S. typhimurium* aderă rapid și selectiv de celulele M, dar poate invada direct prin epiteliul vilozităților. *Salmonella* invadează enterocitele prin mecanismul fagocitozei în vacuole mari, indusă după dezasamblarea microvililor și reorganizarea citoscheletului apical.

Experiențele cu anse intestinale ligaturate au evidențiat că după 30 de minute de la injectare, *Salmonella* induce creșterea volumului celulelor M, înglobarea rapidă a bacteriilor, urmată de degenerarea celulelor M și accesul celulelor infecțioase la structurile mucoasei.

Yersinia pătrunde în mucoasa intestinală pe calea celulelor M: aderă preferențial la celulele M, este înglobată și traversează citoplasma prin transcitoză.

Shigella, un patogen cu localizare intracelulară facultativă, induce leziuni severe ale mucoasei intestinului și colonului, însoțite de pierderea funcției de barieră a epiteliului. *Shigella* aderă de membrana plasmatică, este fagocitată și, după ruperea membranei fagosomului, este eliberată în citoplasmă, unde bacteriile se multiplică, induc asamblarea unei cozi de filamente de actină și sunt extruzate într-o vacuolă de origine membranară, care este fagocitată ulterior de celulele învecinate.

Experiențele cu enterocite intestinale, *in vitro*, au evidențiat că *S. flexneri* nu invadează suprafața apicală dacă joncțiunile epiteliale înguste sunt intacte. Invazia este posibilă numai prin membrana bazolaterală. *In vivo*, *Shigella* invadează mucoasa, în primul rând, pe calea celulelor M, urmată de invazia celulelor epiteliale prin suprafața bazolaterală. Ulcerările mucoasei au cea mai mare frecvență în ileon și în colon, unde foliculii limfoizi și celulele M sunt mai numeroși.

4.5. Toxigenitatea

Toxigenitatea (toxigeneza) reprezintă capacitatea unui agent patogen de a elabora în cursul creșterii sale, una sau mai multe substanțe toxice. Toxigeneza este o proprietate esențială a patogenității bacteriene.

Sub denumirea de *toxină* sunt cuprinse toate substanțele toxice de proveniență biologică (sintetizate de bacterii, fungi, celule vegetale sau animale). Termenul de "toxină" derivă din cuvântul grecesc "toxicon", care înseamnă *otravă*. Unele sunt secretate de celulele bacteriene în cantități foarte mici, fiind proteine cu acțiune predominant *enzimatică* și poartă denumirea generică de *exotoxine*. Altele, de natură lipopolizaharidică (LPS), care nu au acțiune enzimatică și sunt biologic active la concentrații mult mai mari, aparțin *endotoxinelor*. Se cunosc circa 140 de toxine proteice, din care 2/3 sunt produse de bacteriile Gram pozitive, dar și de unele specii de bacterii Gram negative (de exemplu, *Ps. aeruginosa, Sh. dysenteriae, V. cholerae, V. parahaemolyticus, E. coli*). Unele specii bacteriene produc între 5 și 10 tipuri de toxine.

Clasificarea toxinelor bacteriene

Pentru a-și exercita efectul, toxinele trebuie să se elibereze din celule și să se solubilizeze în umorile organismului. După sinteză, toxinele pot rămâne asociate permanent sau temporar cu celula sau sunt eliminate la exterior. Aceste diferențe sunt dependente, în primul rând de specia producătoare, precum și de fazele succesive ale evoluției unei populații bacteriene: faza exponențială, staționară sau de declin. Chiar toxinele care în faza exponențială a culturii bacteriene sunt asociate celulei, în faza de declin se găsesc libere în mediul extracelular datorită lizei celulelor. Din această cauză, studiul raportului topologic între celulă și toxină are semnificație numai pentru faza de evoluție a culturii bacteriene. Din acest punct de vedere se disting următoarele categorii de toxine:

a) *Toxine localizate în celulă* (citoplasmatice) produse de bacterii Gram negative (*Sh. dysenteriae, Y. pestis, B. pertussis, E. coli* etc.) şi Gram pozitive (enterotoxina produsă de *Cl. perfringens*, streptolizina S, pneumolizina produsă de *Str. pneumoniae*, o toxină sintetizată de *Cl. difficile*). Toate sunt de natură proteică. Sunt localizate în citoplasmă sau sunt asociate membranei citoplasmatice şi pot fi eliberate după îndepărtarea peretelui prin liză mecanică sau prin extracţie chimică.

b) *Toxinele constitutive ale peretelui celular*, produse numai de bacteriile Gram negative şi care corespund *endotoxinelor* clasice. Sunt situate în afara membranei citoplasmatice şi fac parte din structura membranei externe a peretelui celular. Din punct de vedere chimic, endotoxinele sunt complexe glicolipidice sau glicolipoproteice. Ele nu sunt niciodată eliberate în cursul fazei de creştere exponenţială, ci numai prin dezagregarea peretelui celular.

c) *Toxinele eliminate* în mediul extern sau *exotoxinele* propriu-zise sunt de natură proteică şi sunt produse mai frecvent de bacteriile Gram pozitive (toxina difterică, toxinele stafilococice, toxina de *B. anthracis* etc.), dar şi de cele Gram negative (*V. cholerae, Ps. aeruginosa*). Exotoxinele îndeplinesc în mod obligatoriu, 3 condiţii:

- se găsesc în mediul de creştere, independente de celula care le-a produs;
- eliberarea lor în mediul extracelular nu necesită autoliza celulei. Celula rămâne viabilă, continuă să crească şi să se multiplice;
- nu se acumulează în celulă.

Aceste criterii se aplică celulelor în faza de creştere exponenţială şi staţionară, deoarece în faza de declin, celulele pot prezenta fenomene de autoliză, independente de sinteza toxinei.

d) *Toxinele cu localizare mixtă* (endocelulară şi exocelulară), în funcţie de faza de evoluţie a culturii bacteriene. În faza exponenţială, toxinele sunt secretate parţial în mediu, dar o fracţie semnificativă rămâne în interiorul celulei şi este eliberată prin autoliză (toxinele tetanică, botulinică).

Mult timp s-a considerat că exotoxinele sunt de natură proteică, iar endotoxinele – de natură lipopolizaharidică. Această diferenţiere nu este netă, deoarece unele toxine proteice aparţin categoriei endotoxinelor, fiindcă rămân asociate celulei producătoare şi invers, uneori, toxinele de natură lipopolizaharidică sunt eliminate la exterior ca exotoxine. De aceea, clasificarea toxinelor trebuie să se facă după criteriul compoziţiei chimice. Din acest punct de vedere, majoritatea exotoxinelor sunt de natură proteică, iar endotoxinele de natură lipopolizaharidică.

Raynaud şi Alouf (1970) au clasificat toxinele în raport cu compoziţia chimică şi cu localizarea celulară.

Grupa I cuprinde toxinele proteice intracitoplasmatice ale bacteriilor Gram negative, eliberate după ruperea mecanică, enzimatică, prin autoliza învelişurilor sau prin extracţie chimică. Sunt sintetizate de *B. pertussis, Sh dysenteriae* (neurotoxina), *Y. pestis*.

Grupa a II-a cuprinde toxinele lipopolizaharidice sau glico-lipo-peptidice (endotoxine), componente structurale ale peretelui celular Gram negativ.

Grupa a III-a cuprinde exotoxinele proteice propriu-zise, produse de *V. cholerae, Cl. tetani, Corynebacterium diphteriae*.

Grupa a IV-a cuprinde toxinele proteice cu localizare intra- şi extracelulară, în cursul fazei logaritmice de creştere: toxinele produse de *Cl. tetani, Cl. botulinum, Cl. oedematiens, Cl. sordelii*.

Din punctul de vedere exclusiv al compoziţiei chimice, se disting:

1) *Toxine proteice*, reprezentate de exotoxinele produse de bacteriile Gram pozitive şi de toxinele proteice intracelulare ale unor bacterii Gram negative: *B. pertussis, Y. pestis, Sh. dysenteriae* (neurotoxina).

2) *Toxine glico-lipo-polipeptidice*, corespunzătoare endotoxinelor.

În raport cu *tropismul* lor se disting: *neurotoxine, enterotoxine, cardiotoxine*, cu efecte limitate la ţesutul respectiv, sau toxine *pantrope*, cu efecte asupra mai multor categorii de ţesuturi.

Determinismul genetic al sintezei toxinelor

Sinteza toxinelor bacteriene este codificată de gena *tox*, a cărei localizare este cromosomală, plasmidială sau fagică. La *V. cholerae*, subunităţile toxinei holerice sunt codificate de gene cromosomale, asociate cu alte gene ce codifică alţi factori de virulenţă. Astfel de grupe de gene de virulenţă se numesc *insule de patogenitate*. Secvenţa lor diferă mult de a altor gene cromosomale, ceea

ce denotă că ele sunt achiziții relativ recente în evoluție. Ar putea să aibă originea prin integrarea unui element genetic exogen – fagul.

La *Cl. botulinum*, gena *tox*, cu situs cromosomal, prezintă mai multe alele, care codifică sinteza a 7 serotipuri de toxina (notate A --- G), care nu dau reacție încrucișată semnificativă cu anticorpii obținuți față de una dintre ele.

Enterotoxinele și hemolizinele de *E. coli*, toxina dermo-exfoliativă stafilococică sunt codificate de gene plasmidiale.

Gena *tox*, codificatoare a toxinei difterice este localizată în genomul unor bacteriofagi ADN (β, P, 1, W). Activitatea ei este controlată de o genă situată pe cromosomul bacterian.

Fagii purtători ai genei *tox* se găsesc în celulele de *C. diphteriae* în stare integrată (profag), de fag virulent replicativ sau sub forma de replicon autonom represat. Este cunoscut modul de funcționare a genei *tox*, purtată de fagul β, ce se integrează ca profag. Ea se găsește aproape de situsul de inserție a genomului fagic în cromosomul bacterian, dar are propriul său promotor și se poate exprima independent de alte gene fagice, dar poate fi represată fără să influențeze biosinteza altor proteine fagice. Această genă nu pare a fi esențială pentru genomul fagic. Modificarea ei mutațională nu influențează ciclul de multiplicare a fagului. Se consideră că gena *tox* a acestui fag este de origine bacteriană, mobilizată prin procesul de transducție fagică.

Sinteza toxinei eritrogene streptococice (scarlatinoasă), precum și a toxinelor botulinice C și D este codificată de fagi temperați. La *Cl. perfringens*, toxigeneza este legată temporal de procesul sporulării. Sporularea este o condiție obligatorie, dar insuficientă pentru producerea toxinei. Toxina pare a fi un produs al unei gene de sporulare și este o proteină de structură a tunicii sporale.

Căile secreției proteinelor la bacteriile Gram negative

Interacțiunea bacteriilor patogene cu celulele gazdă este caracterizată de factori localizați pe suprafața bacteriei sau secretați în spațiul extracelular.

Proteinele bacteriene secretate sunt numeroase, diferite structural și îndeplinesc o varietate largă de funcții: proteoliza, hemoliza, citotoxicitatea, fosforilarea și defosforilarea proteinelor. Transportul acestor proteine din citoplasmă în spațiul extracelular se face pe mai multe căi.

Pentru bacteriile patogene, termenul de *secreție* (sau export) semnifică transportul activ al proteinelor din citoplasmă, prin membrană, la exteriorul bacteriilor Gram pozitive și respectiv, în spațiul periplasmic la bacteriile Gram negative.

Termenul de *translocație* semnifică transferul unei molecule care rămâne la suprafața celulei bacteriene, în membrana citoplasmatică sau în stratul mureinic la bacteriile Gram pozitive sau în membrana internă a bacteriilor Gram negative.

Secreția proteinelor urmează o cale comună la bacteriile Gram pozitive și negative, cu implicarea căii generale de secreție (calea Sec-dependentă). După traversarea membranei citoplasmatice, proteinele translocate urmează căi diferite:

- la bacteriile Gram pozitive, proteinele sunt fie eliberate în mediul extracelular, fie încorporate în peretele celular;
- la bacteriile Gram negative, proteinele translocate prin membrana internă sunt eliberate în spațiul periplasmic.

La bacteriile Gram negative s-au descris 5 căi de secreție a proteinelor (I–V) (fig. 47–48).

Sistemele de secreție de tipul 1 (TOSS) sunt sec-independente, implicate în secreția hemolizinelor de *E. coli*, hemolizinei cu funcție adenilat ciclazică (HlyA) și a hemaglutininei filamentoase (FHA) de la *B. pertussis*, a proteazelor alcaline de la *Ps. aeruginosa*, a leucotoxinelor de la *Pasteurela haemolytica*, a metaloproteazei de *Erwinia chrysantemum*. Secreția unei molecule prin TOSS nu necesită secvență semnal, însă necesită 3–4 proteine accesorii care formează un canal transmembranar prin care sunt transportate proteinele secretate. Genele care codifică pentru proteinele accesorii au secvențe apropiate de genele codificatoare pentru moleculele secretate. Moleculele accesorii sunt omologe și adesea interșanjabile. Energia necesară transportului rezultă prin hidroliza ATP (una dintre proteinele accesorii conține un domeniu de legare a ATP), iar regiunea C-terminală a moleculelor secretate codifică informația necesară secreției. Secreția HlyA se face printr-un proces continuu prin membrana internă și externă.

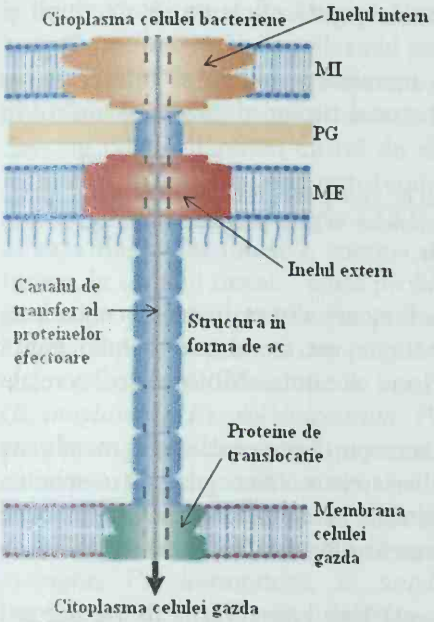


Fig. 46. Structura aciculară proeminentă la suprafața unor bacterii patogene, cu rol în translocația proteinelor efectoare în citoplasma celulei gazdă. Amănunte în text (după Coburn și col., 2007).

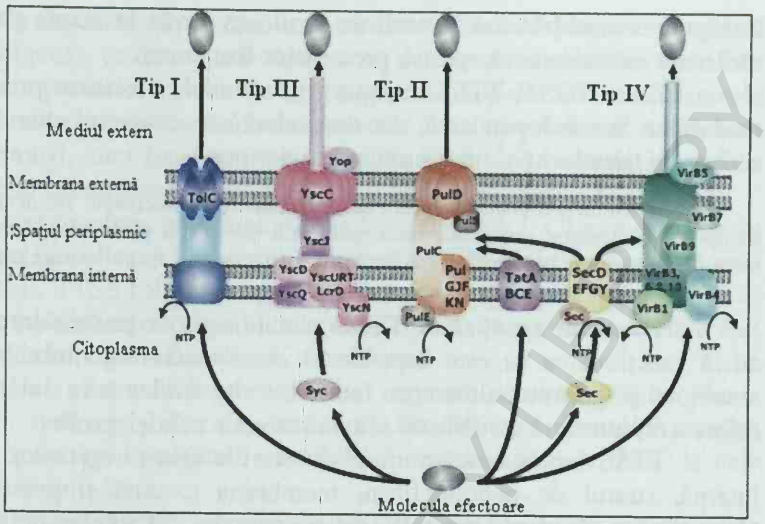


Fig. 47. Reprezentarea schematică a sistemelor de secreție proteică de tip I, II, III, IV. Calea de tip I este exemplificată pentru hemolizina HlyA de la *E. coli*; sistemul de tip III –exemplificat pentru de secreția proteinelor de membrană externă –Yop de la *Yersinia*; sistemul de tip II – exemplificat pentru secreția de pululanaza la *Klebsiella oxytoca*; sistemul de tip IV – exemplificat de de sistemul VirB la *Agrobacterium tumefaciens*. Proteinele HlyB, YscN, SecA și $VirB_{11}$ au rolul de ATP-aze. Moleculele efectoare secretate sunt reprezentate sub forma ovalelor gri. Sistemele de secreție de tip II și IV folosesc chaperonul citoplasmatic SecB. Secreția de tip III implică chaperoni citoplasmatici (SycE), dar nu interacționează cu transloconul Sec al membranei interne. Proteinele structurale majore ale fiecărui sistem sunt reprezentate în învelișul celular (după Henderson și colab., 2004).

Proteinele secretate prin TOSS nu au peptidul *leader* cu rol de semnal, nu sunt supuse clivajului proteolitic, iar semnalul de secreție este localizat în secvența de C-terminală de 60 de aminoacizi a proteinei secretate (C. Hueck, 1998). Nu sunt prelucrate în timpul secreției și nu formează intermediari periplasmici distincți.

Funcționalitatea TOSS, exemplificată de α-hemolizina de *E. coli* și de adenilil-ciclaza de *B. pertussis,* este conferită de 3 proteine: o *proteină a membranei interne* din clasa ABC (ATP binding casette); o *proteină de fuziune* membranară; *o proteină a membranei externe* ce formează un por. Procesul de secreție este inițiat după ce un semnal de secreție de la capătul C-terminal al moleculei destinată secreției interacționează cu proteinele transportoare ABC. Secvența semnal este recunoscută specific de transportorul ABC.

Sistemele de secreție de tipul III (TTSS) funcționează pentru secreția specifică a factorilor de virulență a unor agenți patogeni ai omului, animalelor și plantelor: *Yersinia* spp. (proteina Yops), *Shigella* spp, *Salmonella* spp, *E. coli EPEC, EHEC (O157 : H7), Ps. aeruginosa* (exoenzima S), *Vibrio parahaemolyticus, Bordetella* spp, *Chlamydia trachomatis,* pentru toxinele produse de *Xanthomonas campestris, Ps. solanacearum, Ps. syringae, Erwinia amylovora.*

Proteinele secretate pe *căile de tip I și III* traversează membranele internă și externă într-o singură etapă, nu au secvență *leader* și sunt exportate într-o formă nemodificată. Deoarece proteinele exportate nu au secvență *leader*, ambele căi sunt independente de sistemul *sec* și nu implică prelucrarea N-terminală a proteinelor secretate. Secreția proteinelor pe aceste căi este un proces continuu, fără prezența distinctă a intermediarilor periplasmici.

Sistemul de tip III este specializat pentru secreția factorilor de virulență care nu pot difuza și nu pot pătrunde independent, ci sunt *transferați direct în celulă* și acționează asupra factorilor intracelulari ai gazdei. În general, expunerea celulelor gazdă la proteine de tip III, în absența celulei bacteriene, nu are efect sau efectul este minim. Activitatea unor sisteme de transport de tip III este dependentă sau este stimulată ca răspuns la contactul bacteriei cu celula gazdă. Mecanismul de

transport care eliberează factorii de virulență direct în celula gazdă asigură eficiența interacțiunii și utilizarea cu randament optim a proteinelor bacteriene.

Ca și TOSS, TTSS transportă moleculele efectoare prin membrana internă și externă într-o modalitate Sec-independentă, dar dependentă de contactul cu substratul tisular al gazdei și are rol în secreția și translocația* unor proteine bacteriene.

* Secreția și translocația sunt evenimente distincte funcțional. Termenul de *translocație* este folosit pentru a descrie transportul proteinelor din celula bacteriană, prin membrana plasmatică, în citosolul celulei țintă eucariote, iar *secreția* semnifică transportul proteinelor din citoplasma bacteriană, în spațiul extracelular.

Trăsătura esențială a TTSS este *injectarea* proteinelor efectoare direct în celula eucariotă, adică funcționarea sa este dependentă de contactul agentului patogen cu membrana celulei gazdă eucariote și permite eliberarea factorilor de virulență în interiorul acesteia. Moleculele secretate (efectoare) interferă cu căile de semnalizare ale celulei gazdă.

TTSS funcționează numai la bacteriile Gram negative și transportă proteinele prin membrana internă, stratul de peptidoglican, membrana externă și prin barierele celulei gazdă (membrana plasmatică și chiar prin peretele celulei vegetale). TTSS sunt inductibile la contactul agentului patogen cu celula gazdă și, în esență, au rolul *de a transloca factorii bacterieni de virulență, direct în celula gazdă* în timpul infecției.

Sistemul de secreție de tip III este un mecanism de virulență bine conservat la foarte bacterii Gram negative patogene, dar proteinele secretate sunt foarte diferite. Deși patogenii posedă și alți factori de virulență, *sistemul de secreție de tip III este determinantul esențial al virulenței,* deoarece multe dintre proteinele secretate astfel interacționează direct cu componentele celulare, alterând transducerea semnalelor, sau acționează în citoplasma celulei eucariote în care sunt translocate.

Dintre miile de proteine bacteriene, doar câteva sunt secretate prin sistemul de secreție de tip III în spațiul extracelular sau translocate în celula gazdă.

Sistemul de secreție de tip III este alcătuit din circa 20 de proteine, majoritatea localizate în membrana internă, asemănătoare cu cele din corpusculul bazal al flagelului bacteriilor Gram pozitive și Gram negative. De aceea se presupune că sistemul TTSS a apărut prin duplicarea genelor celulare. Aparatul TTSS necesită o ATP-ază, probabil asociată membranei. Transferul din spațiul periplasmic, prin membrana externă, este mediat de un set restrâns de proteine suplimentare sau pe calea secretorie generală alcătuită din cel puțin 12 proteine.

Semnalul de secreție este secvența de 15–20 de aminoacizi N-terminali ai proteinei secretate. Secvențele N-terminale ale proteinelor secretate pe calea sistemului de tip III nu sunt asemănătoare.

Unele sisteme de secreție de tip III asamblează *structuri macromoleculare* la suprafața celulei bacteriene, care pot fi implicate în translocația moleculelor efectoare în celula eucariotă (fig. 46). Cele mai proeminente sunt structurile cu formă de ac, observate pe imaginile electrono-optice.
La *Salmonella, Shigella* și *Yersinia*, structurile sunt rigide, luminale, lungi de 45–80 nm, cu rolul de a transloca proteinele în celula gazdă, iar la *E. coli* patogenă, „acul" se extinde cu apendice filamentoase care par să faciliteze atașarea bacteriei de celula gazdă prin stratul gros de glicocalix. Acul TTSS este așezat pe o pereche de inele concentrice incluse, unul în membrana internă, celălalt în membrana externă. Cele două inele, asemenea inelelor corpusculului bazal al flagelului, par să formeze o cale de transport directă și continuă prin membrana internă, stratul peptidoglicanic și prin membrana externă.

La bacteriile fitopatogene, structura echivalentă acului este asemănătoare pilului (pilul Hrp). Este flexibilă, luminală, cu lungimea de 2 μm, adaptată să traverseze peretele gros al celulei vegetale.

Varietatea maladiilor cauzate de agenții patogeni la diferite gazde este reflectată de diversitatea proteinelor secretate pe calea sistemului de tip III: unele mediază invazia bacteriei în țesuturile gazdei, altele paralizează ori omoară celula gazdă.

Sistemul de secreție de tip III este funcțional pentru biogeneza flagelului la *Ps. aeruginosa*, pentru secreția proteinei InvA la *Salmonella*, care induce un semnal în celula gazdă ce determină internalizarea bacteriei. InvA este omologă cu MxiA de *Shigella* și cu LcrD de *Yersinia*, de asemenea cu rol în secreția factorilor de invazie.

Calea de secreție de tip III a fost inițial identificată la *Yersinia*, unde funcționează pentru secreția a circa 12 proteine, majoritatea cu rol în virulență (proteinele *Yops* - *Yersinia* outer proteins).

Sh. flexneri posedă o plasmidă de virulenţă, pe care sunt localizate circa 15 gene care codifică antigenele *Ipas* (*i*nvasion *p*lasmid *a*ntigen*s*), ce determină capacitatea de invazie a celulelor epiteliale ale mucoasei colonului, cu apariţia simptomelor clinice de dizenterie. *Salmonella* secretă proteinele *Sip* (*Salmonella* invasion proteins), omologe proteinelor *Ipas*, necesare invaziei celulelor. Antigenele *Ipas* nu conţin peptidul cu rol de semnal, sunt localizate pe suprafaţa externă a bacteriei, dar şi în mediul extracelular şi sunt transferate în celula gazdă prin TTSS, ca şi antigenele *Sip*.

Multe dintre componentele TTSS sunt omologe proteinelor de la baza flagelului. Câteva proteine de la baza flagelului folosesc energia din hidroliza ATP pentru a propulsa moleculele de flagelină prin lumen, la capătul distal. Foarte probabil, TTSS foloseşte un mecanism asemănător, energizat de ATP, pentru propulsarea proteinelor prin canalul central al pilului în celula ţintă. După ce proteina a fost eliberată, plierea poate fi completată de chaperoni citosolici ai celulei ţintă.

Sistemul de secreţie de tip III s-a păstrat la bacteriile Gram negative *patogene pentru plante* (*E. amylovora, Ps. solanacearum, Ps. syringae* şi *X. campestris sp.*). Interacţiunea agentului patogen cu planta gazdă determină procesul infecţios la plantele sensibile şi reacţia *hipersensibilă** la cele rezistente. Genele codificatoare s-au denumit *hrp*.

La unele organisme, genele aparatului de secreţie de tip III sunt localizate pe plasmide specifice patogenilor, absente la speciile nepatogene. La alţi patogeni (*S. typhimurium, EPEC, Ps. syringae, Ps. aeruginosa, E. amylovora, Xanthomonas*), genele codificatoare ale aparatului de translocaţie de tip III sunt localizate pe cromosom.

* Răspunsul hipersensibil al plantelor rezistente nu are nimic comun cu reacţia de hipersensibilitate a mamiferelor şi se caracterizează prin colapsul rapid şi necroza ţesuturilor care au venit în contact cu agentul patogen, urmată de stoparea progresiei procesului infecţios.

Proteina inductoare a reacţiei hipersensibile la plantele rezistente ("harpin") nu are secvenţa clasică N-terminală şi este asociată cu membrana externă, o situaţie omologă cu a proteinelor *Yops* şi *Ipas*, descrise iniţial ca proteine asociate membranei, înainte de a fi secretate în mediul extracelular.

Practic, toate bacteriile Gram negative patogene pentru plante posedă secvenţe omologe genelor *hrp*, cu excepţia *A. tumefaciens*, care produce procesul patologic printr-un mecanism unic.

Descoperirea genelor de virulenţă la bacteriile patogene pentru mamifere şi la cele patogene pentru plante, a căror secvenţă păstrează un grad semnificativ de omologie, a creat o punte de legătură între cele două domenii de cercetare şi ridică probleme de filiaţie între organisme îndepărtate filogenetic (Gijsegem, 1993).

Căile de secreţie II şi *IV*, dependente de sistemul general de secreţie celulară (Sec-dependente), traversează membrana externă şi internă în etape distincte. La ambele sisteme, exportul prin membrana internă, în spaţiul periplasmic, este mediat de sistemul proteinelor de secreţie – *Sec* – dar diferă prin căile pe care proteinele sunt transportate prin membrana externă.

Proteinele secretate pe căile II şi IV se sintetizează pe ribosomii citoplasmatici ca *preproteine*, cu o secvenţă semnal N-terminală ce orientează proteina spre calea de secreţie Sec a membranei interne. Trăsătura definitorie a exportului proteinelor prin sistemul *sec dependent* este prezenţa unei *secvenţe semnal* de circa 30 de aminoacizi hidrofobi la capătul N-terminal al proteinei. Secvenţa semnal uşurează transportul proteinelor în spaţiul periplasmic şi este ulterior *clivată de o peptidază specifică* (signal-peptidază).

Căile de secreţie *sec-dependente* cuprind un set de proteine localizate în membrana internă, o ATP-ază asociată membranei citoplasmatice (Sec A) ce furnizează energia necesară exportului proteinei şi o proteină chaperon care are rolul de a se lega de proteina ţintă înainte de a fi secretată.

Sistemul de secreţie de tip II este varianta principală a căii secretoare generale (gsp) sec-dependentă, utilizată pentru transportul moleculelor prin membrana internă în spaţiul periplasmic. Proteinele accesorii (circa 14) mediază exportul moleculelor prin membrana externă. Cel mai studiat sistem de secreţie de tip II este al pululanazei la *Klebsiella oxytoca*, alcătuit din cel puţin 7 proteine localizate în membrana citoplasmatică şi alte proteine din membrana externă.

Sistemul de secreţie de tip II este calea principală pentru secreţia enzimelor degradative extracelulare, de către bacteriile Gram negative: elastaza, fosfolipaza C, exotoxina A secretată de *Ps. aeruginosa,* pululanaza la *Klebsiella oxytoca*), o lipoproteină ce hidrolizează amidonul şi care,

după ce este secretată în mediul extern, formează micelii, toxina de *V. cholerae,* proteina pililor de tip IV de la *Ps. aeruginosa.*

Aparatul Sec este alcătuit din mai multe proteine: una dintre ele – Sec A – conține situl de legare la ATP, care prin hidroliză furnizează energia necesară transportului ATP-ază. Alte câteva proteine sunt integrate în membrana internă; o semnal-peptidază clivează o secvență semnal N-terminală implicată în procesul de export al moleculelor în spațiul periplasmic. Aici, restul proteinei adoptă o stare quasi-nativă, facilitată de chaperoni.

Transportul prin membrana externă necesită alte 12–16 proteine accesorii, din clasa celor integrate, ce poartă denumirea generică de secreton.

Calea de secreție de tip IV (TFSS) este funcțională pentru o serie de toxine bacteriene care sunt eliberate din celulă printr-un *mecanism de autotransport.* Autotransportorii utilizează un sistem *sec*-dependent şi necesită clivarea unei secvențe semnal pentru translocația prin membrana internă. Proteinele sistemului de secreție de tip IV traversează membrana externă şi formează un por prin care trece proteina secretată. Proteinele secretate traversează membrana externă în virtutea secvenței C-terminale, care este îndepărtată enzimatic după ce proteina este eliberată din membrana externă: astfel sunt secretate toxinele-enzime cu activitate *proteazică* specifică ce clivează IgA produse de *N. gonorrhoeae, N. meningitidis, H. influenzae, citotoxina vacuolantă* sintetizată de *Helicobacter pylori, serin-proteaza* de *Serratia marcescens,* o familie de proteine din membrana externă la *B. pertussis,* toxinele secretate de *Sh. flexneri* şi de *E. coli* enteropatogenă (EPEC). Sistemul de secreție de tip IV funcționează şi la celulele eucariote.

Prototipul acestei căi de secreție este transferul nucleoproteinei T-ADN de la *A. tumefaciens,* în celula vegetală.

Funcțional, TFSS se aseamănă cu aparatul de conjugare: ambele au capacitatea de a transloca proteine, intercelular (de la bacterie la alta sau de la celula bacteriană în celula eucariotă).

Al *V-lea sistem* pentru secreția macromoleculelor (fig. 48) transportă toxine polipeptidice sau complexe ADN-proteine, între două celule bacteriene sau între o celulă bacteriană şi o celulă eucariotă: toxina de *B. pertussis; H. pylori* secretă factorul inductor la sintezei IL-8. Aceeaşi cale este implicată în transferul conjugativ al plasmidelor.

Proteinele pot fi secretate prin sistemul de autotransport (Va) sau pe calea de secreție cu două componente (Vb). Structura primară a proteinei autotransportate cuprinde 3 domenii:

- secvența semnal (*leader*) la capătul N-terminal;
- domeniul α al proteinei transportate, cu funcție efectoare;
- domeniul C-terminal, β, cu rol în autotransport, denumit unitatea de translocare.

Secvența semnal orientează proteina spre membrana internă. După trecerea prin membrana internă, proteina autotransportată se găseşte ca formă intermediară, în spațiul periplasmic. Domeniul α rămâne temporar extins în spațiul periplasmic, iar domeniul C-terminal trece în membrana externă. Domeniul α se pliază în periplasmă, înainte sau simultan cu translocația prin membrana externă.

Domeniul β are conformație β-pliată. La capătul C-terminal, aminoacidul este totdeauna fenilalanina sau triptofanul, precedat de resturi alternante hdrofile şi hidrofobe.

Prin analogie cu modelul biogenezei porinelor, modelul (Henderson şi colab., 2004) presupune că preproteina autotransportată se inseră spontan în membrana externă, în conformație β-pliată, pe măsură ce interacționează cu mediul hidrofob. Domeniile β stabilesc legături de H antiparalele şi formează spontan o structură inelară cu diametrul de 2 nm, care constituie porul prin care este transportat domeniul α.

Domeniul efector poate fi prelucrat şi eliberat în mediul extern; este clivat şi rămâne în contact cu suprafața celulei prin interacțiune necovalentă cu domeniul β sau nu este clivat şi rămâne ca o proteină al cărei domeniu C-terminal este ancorat în membrană.

Sursa de energie (ATP sau GTP) nu există în periplasmă, iar la nivelul membranei externe lipseşte forța proton-motrice. Forța care controlează translocația domeniului efector prin membrana externă derivă chiar din plierea sa corectă pe suprafața celulei.

Domeniile efectoare ale proteinelor autotransportate sunt foarte diverse, iar funcțional sunt factori de virulență (proteaze, peptidaze, lipaze şi esteraze), sunt implicate în motilitate, au rol de adezine, sunt proteine imunomodulatoare, toxine etc.

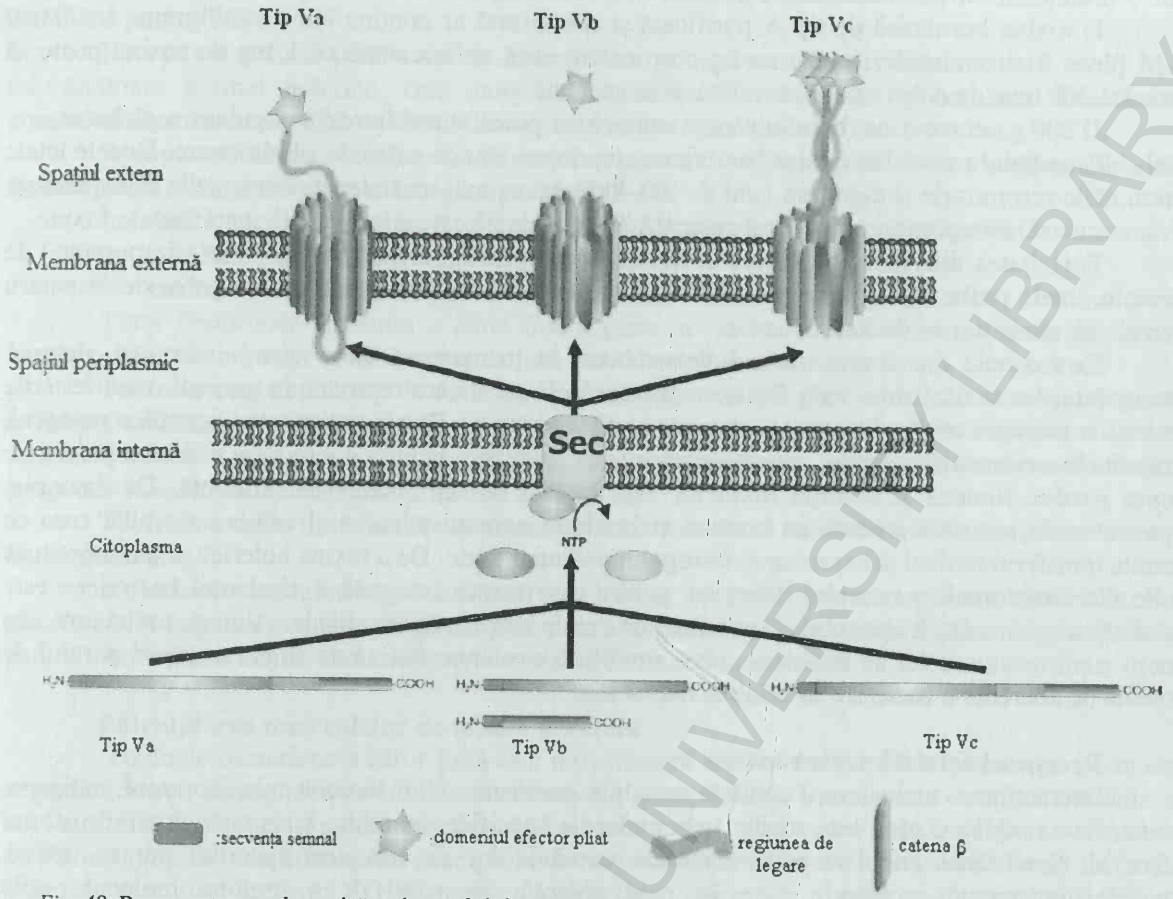


Fig. 48. Reprezentarea schematică a sistemului de secreție de tip V. Sunt reprezentate cele 4 domenii funcționale ale proteinelor: secvența semnal, domeniul efector, regiunea de legare (linker), domeniul β. Poliproteinele autotransportate sunt sintetizate și exportate, în general, prin membrana citoplasmatică *via* aparatul Sec. Secvența semnal este extinsă la toate cele 3 tipuri de secreție tip V. In membrana internă, secvența semnal este clivată și domeniul β se inseră în membrana externă într-o conformație β, formând un por în membrana externă. După dobândirea conformației β, domeniul efector se inseră în por și este translocat la suprafața celulei bacteriene, unde poate să fie sau nu prelucrat ulterior. NTP = nucleozid-trifosfați (ATP, GTP) (după Henderson și colab., 2004).

Mecanismele de autotransport funcționează numai la *Bacteria* și în primul rând la *Proteobacteria* (α, β, γ, ε Proteobacteria), dar și la *Chlamidiae*.

Calea de transport de tip V cu două componente se deosebește de calea autotransportului prin aceea că domeniul α (efector) și domeniul β (transportor ce formează porul) sunt sintetizate ca molecule distincte.

Toxicitatea

Exotoxinele sunt termolabile, au toxicitate foarte înaltă, mai ales în formă purificată, iar prin inactivare rezultă anatoxine. Astfel, toxina botulinică de tip D este de trei milioane de ori mai puternică decât stricnina luată ca etalon, iar toxinele tetanică, neurotoxina de *Sh. dysenteriae* și cea botulinică de tip A sau B, de un milion de ori.

Efectul toxic este variabil nu numai în funcție de specia bacteriană, ci și de tulpina producătoare, chiar pe medii optime. În multe cazuri, toxigeneza se atenuează sau chiar dispare prin subcultivare repetată.

În general, efectul toxinelor este variabil în funcție de natura, vârsta, greutatea, sexul și linia genetică a animalelor pe care sunt testate, ca și de tehnica și calea de administrare folosite.

Datele referitoare la toxigeneză se referă la administrarea lor parenterală, deoarece cu excepția enterotoxinelor, toxinele uzuale sunt distruse de modificările de pH sau de activitatea enzimelor digestive.

BCU CLUJ / UNIVERSITY LIBRARY

Potențialul toxic al toxinelor este ilustrat de date teoretice:

1) toxina botulinică de tip A purificată şi cristalizată ar conține într-un miligram, 1.000.000 DLM (doze limite mortale) pentru un kg corp cobai, ceea ce înseamnă că 1 mg de toxină poate să omoare l 200 tone de cobai sau două milioane de şoareci;

2) 200 g neurotoxine (botulinică sau tetanică) ar putea omorî întreaga populație a globului.

Potențialul toxic al toxinelor bacteriene este dependent de calea de administrare. Dozele letale pentru căile respiratorie şi digestivă sunt de l00–l000 de ori mai mari decât pentru căile intravenoasă, intramusculară, intraperitoneală sau subcutanată. Pielea intactă este o barieră eficientă față de toxine.

Toxicitatea diferitelor probe ale aceleiaşi toxine poate prezenta variații foarte importante: de exemplu, unele probe de toxină botulinică sunt de 6000 de ori mai toxice pentru cobai decât pentru şoarece, iar altele numai de 3 ori.

Exotoxinele au, uneori, un rol determinant în patogeneza unor agenți infecțioşi, datorită potențialului lor toxic foarte înalt. De exemplu, toxinele purificate reproduc în general, manifestările clinice ale infecției cu *V. cholerae*, *C. tetani* sau *C. diphteriae*. Dar la majoritatea agenților patogeni, exotoxinele acționează sinergic cu alte componente celulare pentru a produce efectele potențiale asupra gazdei. Sinteza şi secreția toxinelor este reglată de alți factori de virulență. De exemplu, capacitatea de aderență creează un contact strâns între agentul patogen şi celula sensibilă, ceea ce permite transferul toxinei şi exprimarea întregului potențial toxic. Deşi toxina holerică poate reproduce multe din simptomele procesului infecțios, pentru exprimarea integrală a virulenței bacteriene este necesară *adezina* care leagă celula bacteriană de celula mucoasei intestinale. Alteori, toxina are alte funcții suplimentare celei de toxicitate, care amplifică virulența: toxina de *B. pertusis* are şi rolul de proteină de aderență a bacteriei, la celulele mamaliene.

Receptori celulari pentru toxine

Interacțiunea toxinelor cu celulele sensibile, asemenea altor biomolecule (hormoni, antigene, lectine, fatori reglatori etc.) este mediată de molecule specifice denumite *receptori*, situate în stratul extern al membranei citoplasmatice. Celulele sensibile nu au receptori specifici pentru toxine. Toxinele împrumută receptorii, care în mod obişnuit au rolul de a îngloba molecule utile metabolismului celular.

Se cunosc receptorii prin intermediul cărora câteva toxine interacționează cu suprafața celulei. De exemplu, receptorul celular pentru streptolizina O (SLO), pentru listeriolizină (LLO) şi pentru pneumolizină (PLO) este *colesterolul*. Aceste toxine se fixează pe suprafața celulei prin intermediul colesterolului membranar şi nu depind de alți receptori de suprafață. De aceea, ele pot să lizeze membranele, teoretic, ale oricărei celule animale.

Toate toxinele acestui grup sunt alcătuite dintr-o singură catenă polipeptidică, a cărei lungime variază de la 471 aminoacizi (pentru pneumolizină) până la 571 pentru streptolizina O. Variația lungimii se datorează în întregime secvențelor localizate la capătul N-terminal, a căror funcție rămâne necunoscută. Cea mai lungă secvență, cu omologie aproape perfectă la toxinele grupului este de 11 aminoacizi şi este bogată în triptofan.

Secvența comună pentru toate aceste molecule şi esențială pentru activitatea citolitică, corespunde celei mai mici secvențe - a *pneumolizinei*. Pneumolizina se deosebeşte de celelalte toxine ale grupului, prin absența peptidului semnal secretor şi din această cauză este eliberată numai prin liza celulelor de *Str. pneumoniae*.

Aceste toxine nu se leagă de membranele care nu conțin colesterol sau un compus înrudit cu colesterolul. Interacțiunea cu colesterolul se produce în absența altor lipide. Toxinele interacționează chiar cu sterolul pur în soluție sau în suspensie şi rezultatul este inhibiția activității litice.

Alte câteva toxine au ca receptori moleculele de *gangliozide*. Acestea sunt *glicolipide*, mai abundente în neuroni, alcătuite dintr-o componentă oligozaharidică legată de un ceramid (acid stearic şi sfingozină). Gangliozidele diferă între ele, prin numărul şi secvența resturilor glucidice componente, în special a acidului N-acetil neuraminic (NANA) sau de acid sialic.

Toxina *tetanică* se leagă de gangliozide, în special de di- şi tri-sialogangliozide, care conțin două şi respectiv trei resturi de acid sialic, atașate de galactoză. Între toxina tetanică şi hormonul tirostimulator (TSH) există o competiție de legare strict reciprocă, pe membrana celulelor tiroidiene.

Astfel s-a dedus că receptorul neuronal pentru toxina tetanică este asemănător cu receptorul celulei tiroidiene pentru TSH.

Receptorul celular pentru toxina *holerică*, ca şi pentru toxina termolabilă de *E. coli*, foarte asemănătoare toxinei holerice, este gangliozidul GM_1. S-a evidenţiat o corelaţie directă între conţinutul membranar în GM_1 şi sensibilitatea tisulară la toxină.

Receptorul celular al toxinei de *B. pertussis* pare a fi tot o gangliozidă care conţine acid sialic, iar receptorul toxinei difterice ar fi o glicoproteină.

În raport cu localizarea ţintei lor moleculare se disting două categorii de toxine:

- cele care au ţinta finală la nivelul *membranei*;
- toxine a căror ţintă finală este *citoplasmatică*.

Ţinta finală este structura a cărei interacţiune cu toxina produce efectul toxic, în timp ce receptorul are uneori rolul de ţintă intermediară, deşi alteori este chiar ţinta finală.

Toxinele care acţionează la nivelul *membranei* sunt active prin modificări structurale pe care le induc în membrana citoplasmatică, urmate de ruperea acesteia. Consecinţa este *citoliza* ori moartea celulei. Toxinele care consecutiv acţiunii lor produc dezorganizarea membranei se numesc *citolizine* (respectiv *hemolizine*, dacă celula ţinta este eritrocitul).

Toxinele a căror ţintă finală este intracelulară, traversează mai întâi membrana pentru a ajunge în citoplasmă.

Moleculele suprafeţei *eritrocitului*, cu rol de receptor pentru toxinele bacteriene, sunt *glicolipidele*. Legarea toxinelor de glicolipide pare a fi mai avantajoasă decât legarea de glicoproteine, pentru interacţia cu membrana, care este esenţială pentru acţiunea toxică.

Pătrunderea moleculelor de toxină în celulă

Toxinele bacteriene a căror ţintă este intracelulară sunt molecule bifuncţionale, ca şi toxinele vegetale (ricina, abrina), bacteriocinele sau hormonii glicoproteici. Toate aceste categorii de molecule sunt alcătuite după acelaşi model funcţional, fiind monomere (de exemplu, toxina difterică, exotoxina de *Ps. aeruginosa*) sau dimere (de exemplu, enterotoxina holerică şi cea termostabilă de *E. coli*). Cele monocatenare au o secvenţă COOH-terminală, prin care se leagă la nivelul receptorului şi o secvenţă NH_2-terminală, care pătrunde în citoplasmă şi interacţionează cu ţinta intracelulară. Pentru toxinele dublu catenare, funcţiile de legare *B* (*B*inding) şi de activitate propriu-zisă *A* (*A*ctivity) sunt realizate separat de fiecare catenă.

Pătrunderea moleculei de toxină în celulă este un proces complex pentru majoritatea toxinelor cu acţiune intracelulară şi se face prin unul din următoarele mecanisme:

- endocitoza mediată de receptori;
- pinocitoza nespecifică în faza lichidă;
- transferul direct al moleculei prin membrana citoplasmatică.

Înglobarea prin mecanismul endocitozei mediate de receptori conferă specificitate şi eficienţă acţiunii moleculelor mari. Receptorii celulari glicoproteici, după interacţiunea cu moleculele de toxină, suferă o dinamică accentuată. În mod normal, moleculele cu rol de receptor sunt uniform distribuite în planul membranei sau sunt concentrate în teritorii specializate denumite zone *tapetate cu clatrină** (*coated pits*), un înveliş de natură proteică pe faţa citoplasmatică a membranei. După legarea moleculei de toxină, complexele receptor-toxină se aglomerează în zonele tapetate cu clatrină, situate la baza microvilozităţilor. Zonele respective se intruzează şi formează *vezicule acoperite cu clatrină*, cu rol de transport. În citoplasmă, învelişul de clatrină se dezorganizează şi receptorii celulari deveniţi disponibili sunt reciclaţi spre suprafaţa celulei, iar molecula de toxină este eliberată spre un situs intracelular specific.

* *Clatrina* este o proteină mare, oligomerică, ce formează o reţea pe suprafaţa internă a membranei plasmatice, favorizând intruzia membranei şi formarea unei vezicule tapetată cu reţeaua moleculară, care ulterior poate fuziona cu alte organite celulare.

Mecanismele de acţiune a exotoxinelor

Efectul biologic al exotoxinelor este specific şi este datorat afinităţii lor caracteristice pentru anumite celule-ţintă ale organismului.

Unele toxine (tetanică, difterică, botulinică, holerică, eritrogenă) au un rol determinant în patogenitatea bacteriană. Primele patru enumerate mai sus, sunt factori unici ai patogenității pentru bacteriile producătoare. În cazul holerei, gravitatea infecției este consecința efectelor fiziopatologice nespecifice ale toxinei asupra mucoasei intestinale ce constau în pierderea apei și sărurilor minerale la acest nivel.

Eritemul specific scarlatinos, produs de *Str. pyogenes* se datorează efectului primar al toxinei eritrogene streptococice.

Enterotoxinele stafilococice și enterotoxina de *Cl. perfringens* produc efecte la nivelul mucoasei intestinale, ca rezultat al intoxicației alimentare.

Toxina produsă de *Sh. dysenteriae* este cauza dizenteriei, deoarece enterocitele și celulele endoteliale ale vaselor mici se lizează sub acțiunea toxinei, rezultatul fiind ulcerarea mucoasei intestinale.

Exotoxina de *B. anthracis* produce un edem local și hemoragie, iar în cazul septicemiei, efectul letal pare a fi datorat neurotropismului său, cu acțiune în special asupra centrului bulbar al respirației.

Efectele biologice ale toxinelor se produc la nivelul diferitelor structuri celulare. De exemplu, hemolizinele și leucocidinele acționează la nivelul membranei citoplasmatice, iar alte toxine sunt active asupra organitelor, asupra catenei transportoare de electroni ș.a.m.d.

Toxinele perturbă funcțiile celulei gazdă: influențează căile de transducere a semnalelor, rearanjează citoscheletul și traficul vacuolar.

Uneori, toxine cu structură asemănătoare pot genera manifestări clinice foarte diferite. De exemplu, toxina botulinică ingerată odată cu alimentele, produce o paralizie flască datorată acțiunii la nivelul terminațiilor nervoase periferice, iar toxina tetanică, eliberată în rănile profunde contaminate cu *C. tetani* produce paralizia spastică prin intermediul sistemului nervos central. Ambele toxine acționează prin același mecanism: blocarea eliberării mediatorilor sinaptici prin clivarea *sinaptobrevinelor*, proteine componente ale veziculei sinaptice. Toxina tetanică blochează eliberarea mediatorilor glicină și GABA, în timp ce toxina botulinică blochează eliberarea acetilcolinei. Ambele proteine sunt *metaloendoproteaze* și se aseamănă prin domeniile care leagă Zn.

În funcție de mecanismul de acțiune, exotoxinele se clasifică în: toxine cu conformație de tip AB, toxine formatoare de pori, toxine cu domeniul RTX, proteaze ale IgA, toxine termostabile, toxine care modifică citoscheletul gazdei (fig. 49).

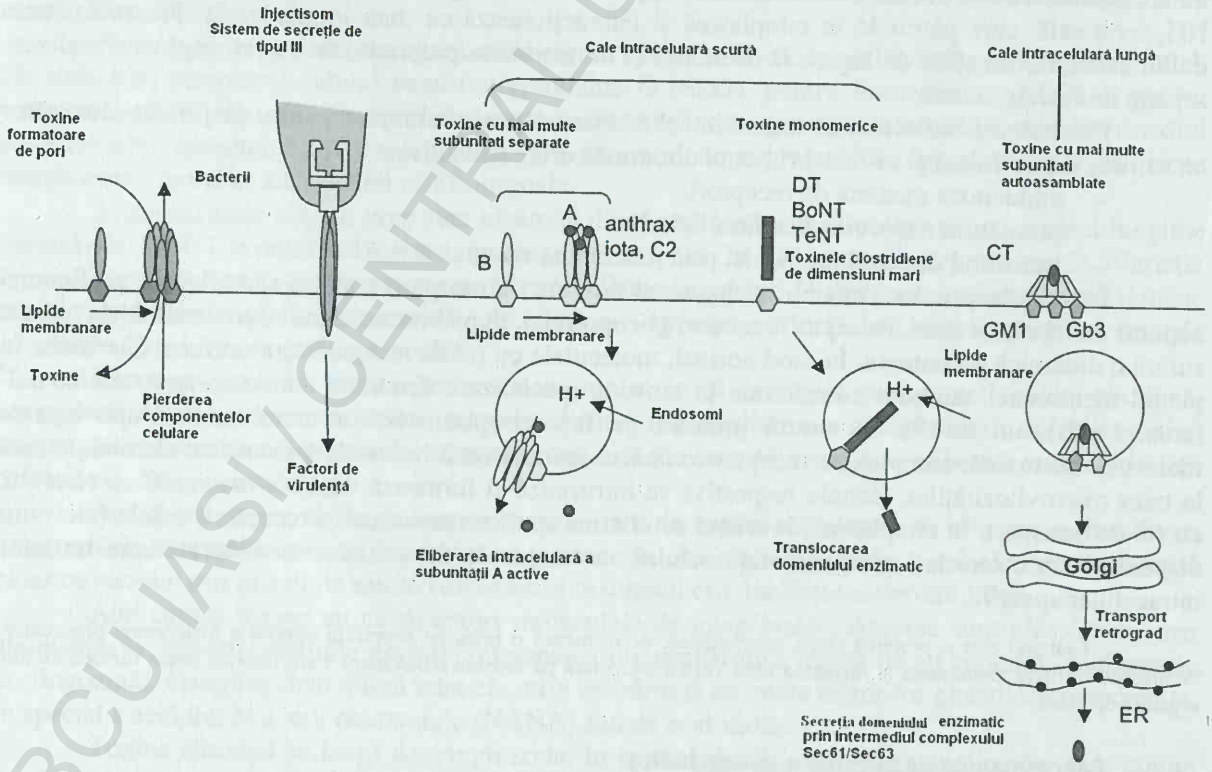


Fig. 49. Reprezentarea schematică a mecanismelor de acțiune ale diferitelor exotoxine de natură proteică (după Geny și Popoff, 2006).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Toxinele cu conformație de tip AB sunt alcătuite din 2 subunități:

- subunitatea A (*active*), determină activitatea enzimatică, toxică (activitate ADP-ribozilantă – toxina holerică, pertusică, activitate proteolitică – toxina tetanică, toxina botulinică) și prezintă atât regiuni conservate, în special în regiunile importante pentru activitatea enzimei, cât și regiuni variabile;
- subunitatea B (*binding*) care permite legarea de receptorii celulei gazdă și facilitează eliberarea subunității active în interiorul celulei gazdă.

Cele două subunități pot fi localizate pe aceeași catenă polipeptidică (toxina diferică), pe două catene separate (toxina botulinică) sau pot avea formula AB5, cele 5 subunități B fiind asociate necovalent (toxina pertusică).

Activitatea enzimatică a subunității A produce efecte foarte variabile, de la cea ADP-ribozilantă (toxinele holerică, pertusică, diferică, toxina termolabilă de *E. coli*, exotoxina A de la *Ps. aeruginosa* ADP-ribozil-transferazele – C_2 și C_3 produse de *Cl. botulinum*), până la acțiunea *proteolitică* (toxinele tetanică și botulinică).

O categorie aparte o formează următoarele toxine binare:

- toxina C_2 (produsă de *Cl. botulinum*);
- *CDT* (produsă de *Cl. difficile*);
- toxina *i* (iota produsă de *Cl. perfringens*);
- *CST* (produsă de *Cl. spiroforme*);
- toxinele edematoasă și letală (*B. anthracis*);
- *VIP* (proteinele insecticide produse de celulele vegetative de *B. cereus*).

Subunitățile CDT, CST și *i* au secvențe ale aminoacizilor foarte asemănătoare și sunt interșanjabile, ceea ce relevă o cale comună de evoluție a acestor agenți patogeni într-o nișă comună, asociați cu maladia gastrointestinală la om și animale.

Spre deosebire de alte toxine binare, subunitățile acestor toxine nu se leagă de receptorii celulari sub forma complexului AB. Interacțiunea lor cu celulele implică legarea inițială a componentelor B la receptorii celulari, ca monomeri, apoi formează homoheptameri pe suprafața sau în interiorul celulei. Monomerii B sunt generați numai după proteoliza precursorilor. Complexul heptamer B-receptor celular are rolul de suport pentru legarea componentei enzimatice A, după care este endocitat. În endosom, homoheptamerul se inseră în membrana veziculei, formând un por prin care componenta enzimatică A este translocată în citosol, unde produce efectul toxic prin unul dintre cele 3 mecanisme (fig. 50):

- mono-ADP-ribozilarea actinei G, ce determină dezorganizarea citoscheletului și moartea celulei;
- proteoliza protein-kinazelor activate de mitogeni și inhibarea semnalizării celulare;
- creșterea nivelului AMP ciclic, ce duce la edem și imunosupresie.

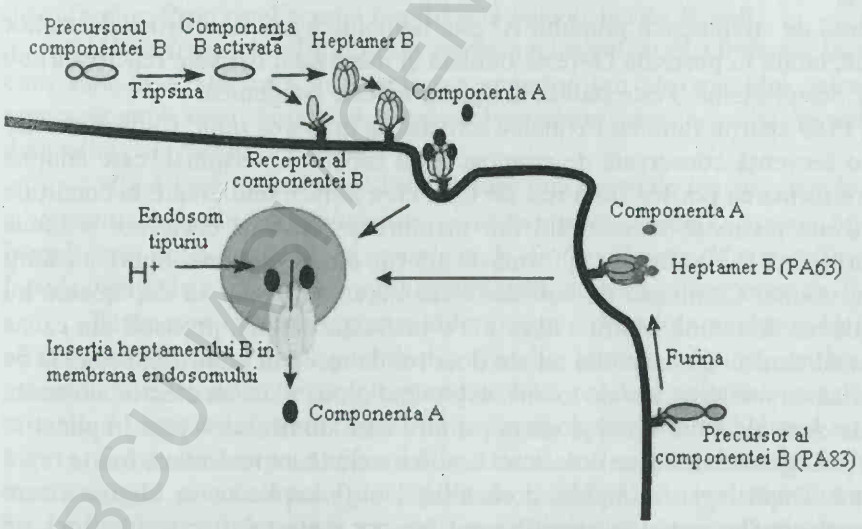


Fig. 50. Reprezentarea schematică a mecanismului toxic al toxinelor binare de *Clostridium sp.* și *Bacillus sp.* Toxinele sunt formate din două subunități – A și B – neasociate în soluție sau pe suprafața celulei. Componenta B activată în mediul extracelular interacționează cu receptorii celulari, fie ca homo-heptameri inelari preformați sau ca monomeri ce se asamblează ulterior heptameri. Componenta enzimatică A se leagă la heptamerul B legat de celulă și complexul receptor holotoxină este înglobat pe calea EMR în endosomi ce se acidifică sub acțiunea ATP-azei din membrana vacuolară. Aciditatea endosomului este esențială, deoarece heptamerul B se modifică conformațional și se inseră în membrană formând un canal prin care, probabil, componenta A este translocată în citosol. Excepția o constituie precursorul antigenului protector (PA83) de la *B. anthracis*, deoarece se leagă de receptorul celular și ulterior este clivat (după Barth și colab. 2004).

Toxinele cu acțiune enzimatică (toxina Shiga, toxina holerică, toxina pertusică, toxina difterică și exotoxina A de *Ps. aeruginosa*) sunt clivate proteolitic pentru a produce fragmentul A catalitic activ.

Multe toxine neenzimatice care se inseră în membrana celulei eucariote, necesită clivajul proteolitic pentru a permite oligomerizarea și formarea porilor: hemolizina de *V. cholerae* El Tor este clivată N-terminal, iar aerolizina, toxina α de *C. septicum* și citotoxina de *Ps. aeruginosa* sunt clivate C-terminal. Hemolizina de *E. coli*, formatoare de pori, reprezintă o clasă unică de toxine ce necesită prelucrarea posttraducere pentru activare.

Toxinele formatoare de pori

Numeroase microorganisme patogene cu localizare intracelulară produc proteine care pot să lizeze membrana celulei eucariote. Câteva dintre aceste toxine sunt esențiale pentru patogenitate. Rolul lor este diferit, de la blocarea funcției celulelor imunitare, până la medierea ieșirii din vacuola de fagocitoză în citosol. Toxinele formatoare de pori acționează prin inserția toxinei în membrana plasmatică a celulelor gazdă, urmată de oligomerizarea monomerilor și formarea unor complexe parțial sau total circulare (por sau canal) care vor induce liza celulară (de exemplu, toxinele RTX produse de *E. coli*, *Bordetella sp.*, *Actinobacillus sp.*, *Proteus sp.*, *Pasteurella sp.*), toxinele α, β, γ, δ produse de *Staphylococcus sp.*, *Clostridium sp.*, toxinele tiol-activate produse de *Clostridium sp.*, *Listeria sp.*, *Streptococcus sp.*, *Bacillus sp.* Procesul de formare a porilor este independent de ATP. Rolul acestor toxine în patogeneză este puțin investigat, cu excepția listeriozinei care determină evadarea *Listeriei* din vacuola de fagocitoză.

Citolizinele (citotoxinele) sunt definite ca proteine care omoară celulele țintă. Ele pot acționa intracelular sau la nivelul membranei și formează *pori*. Efectul lor constă în liza eritrocitelor (hemolizine), leucocitelor (leucocidine) și celulelor tisulare. Citotoxinele cu acțiune intracelulară se leagă la nivelul receptorilor membranari și sunt prelucrate înainte de a ajunge în citoplasmă.

Mecanismele de acțiune ale citotoxinelor sunt diferite:

- inhibiția sintezei proteinelor celulare;
- inhibiția formării filamentelor de actină;
- formarea porilor membranari.

Formarea porilor în structura membranei țintă este un mecanism major de acțiune a citotoxinelor. Astfel de citotoxine se pot detecta prin activitatea lor litică asupra eritrocitelor, motiv pentru care se mai numesc hemolizine. Liza eritrocitelor poate fi un mecanism de dobândire a Fe.

Formarea porilor induce un set larg de reacții secundare în celulele nucleate: eliberarea citokinelor, disfuncția citoscheletului, sinteza mediatorilor lipidici. Liza leucocitelor poate determina scăderea reactivității imunitare.

Streptolizina O, produsă de streptococii grupului A, este hemolitică pentru eritrocitele multor specii de mamifere, antigenică, labilă în prezența O_2 (este oxidată și inactivată, dar este reactivată sub acțiunea agenților reducători). Streptolizina S este stabilă la O_2, dar nu este antigenică.

Toxinele SLO, LLO, PLO aparțin familiei toxinelor activate de gruparea *thiol*. Capacitatea lor de a *forma pori* depinde de o secvență conservată de aminoacizi la capătul C terminal, care conține resturi de Trp, esențiale pentru formarea porilor și un rest de Cys, care le face intolerante la condițiile oxidante. Toxinele *thiol* -activate recunosc colesterolul din membrana celulelor eucariote și induc formarea unor pori mari inelari (până la 30 nm) sau în formă de arc (de dimensiuni mai mici), alcătuiți din cca. 50 de monomeri de toxină. Cantitatea de colesterol membranar trebuie să depășească cu câteva ordine de mărime cantitatea de toxină pentru a avea loc o interacție stabilă, probabil din cauza unor restricții sterice sau termodinamice. Colesterolul nu are doar rol de receptor pentru moleculele de toxină, ci mediază și oligomerizarea monomerilor de toxină, acționând probabil ca un efector alosteric.

Toxinele thiol-activate sunt alcătuite din 4 domenii, dintre care domeniul 4 este implicat în legarea de receptor (colesterol). Legarea inițială de colesterol este reversibilă, se realizează foarte rapid și independent de temperatură. După legarea inițială, domeniile 1 și 3 implicate în oligomerizare suferă modificări alosterice care conduc inițial la apariția unui pre-por metastabil, care ulterior este stabilizat prin forțe de tensiune superficială. Porii incompleți, în formă de arc, permit de asemenea inserția moleculelor de toxină în membrană.

Rolul biologic major al acestor toxine este de a permite pătrunderea în interiorul celulei eucariote a altor toxine sau enzime bacteriene, prin porii de dimensiuni mari. În cazul bacteriilor intracelulare, aceste toxine (de exemplu, listeriolizina) permit propagarea infecției de la o celulă la alta.

Toxinele thiol-activate se găsesc la bacterii care au un mod de viață asemănător. *Listeria* și *Streptococcus* produc infecții invazive, iar toxinele lor sunt determinanți de patogenitate. Aceste bacterii produc enzime depolimerizante (proteaze, nucleaze) secretate concomitent cu toxinele. Porii formați de toxinele activate de thiol sunt mari și constituie calea de acces a acestor enzime în interiorul celulei. Toxina și enzimele cooperează pentru degradarea celulelor animale, în beneficiul agentului patogen.

În cazul infecțiilor clostridiene – gangrena gazoasă sau tetanosul, cele două moduri de viață prezintă convergențe evidente: toxinele pot fi implicate atât în stadiul inițial al lezării țesutului, necesar pentru realizarea unui mediu anaerob, cât și în stadiul tardiv (postmortem), caracterizat prin distrugere tisulară rapidă și masivă.

Listeriolizina este produsă intracelular și se abate de la condițiile de acțiune ale altor lizine, prin necesarul unui pH acid optim pentru acțiunea ei. Mediul acid este creat în fagosom, din care *Listeria* se eliberează prin secreția toxinei.

Unele toxine funcționează prin *inserția în membrana* celulei sensibile, formând un por sau canal, care duce la liza celulei prin mecanisme osmotice. O astfel de familie este formată de *toxinele RTX* (repeats in toxins – denumire datorată repetării unei secvențe de 9 aminoacizi în fiecare toxină), produse de bacteriile Gram negative.

Toxinele RTX prezintă omologie de secvență și organizare genetică, precum și căi de secreție și activare similare:

- nu au secvență peptidică semnal și nu sunt clivate proteolitic în vederea maturării;
- regiunea COOH-terminală este implicată în secreția toxinei, pe calea sistemului de secreție de tip I;
- necesită un aparat secretor constituit dintr-un complex transmembranar format din mai multe proteine;
- sunt secretate fără acumularea intermediarilor periplasmici;
- prezintă unui reziduu de 9 aminoacizi, bogat în Gly, care leagă ionii de Ca^{2+}, repetat de mai multe ori în partea C-terminală. Când leagă Ca^{2+}, secvențele repetitive RTX formează scurte lanțuri β-pliate, organizate într-o structură neobișnuită de suprahelice-β. Legarea Ca^{2+} este o necesitate absolută pentru o activitate citotoxică și se produce după exportul proteinei. Nivelul intracelular al Ca^{2+} este prea mic (0,1 μM) pentru a activa Hly A.

Toxinele au fost grupate pe baza efectelor toxice și litice asupra celulelor gazdă ale mamiferelor. Prototipul acestei familii este *hemolizina* de *E. coli*.

Hemolizina A (Hly A) este un factor important al virulenței în infecțiile extraintestinale, așa cum sunt cele ale tractului respirator superior sau ale tractului urinar, produse de *E. coli*. Este reprezentantul unei familii de toxine bacteriene care necesită modificarea posttraducere pentru dobândirea activității biologice.

Hly A face parte dintr-o familie care mai cuprinde *leucotoxina* de *Y. haemolytica*, *hemolizinele* și *leucotoxinele* de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *toxina bifuncțională* (adenilat-ciclază/ hemolizină) de *B. pertussis* și *hemolizinele* de *P. vulgaris, Morganella morganii* și *Moraxella bovis*, față de care există o identitate a secvenței aminoacizilor în proporție de 30-75%.

Toate sunt citotoxice pentru diferite tipuri de celule nucleate. Hemolizina de *E. coli* lizează în câteva minute eritrocitele diferitelor specii: șoarece, iepure, berbec, bovine, cal, om, dar și granulocitele, monocitele, celulele endoteliale, celulele epiteliale renale de șoarece, rumegătoare și primate. Absența receptorilor specifici poate să explice spectrul larg al acțiunii Hly A.

Eritrocitele expuse acțiunii Hly A de *E. coli* suferă schimbări majore ale citoscheletului care se exteriorizează prin formarea proiecțiilor de suprafață. Liza eritrocitelor poate să semnifice eliberarea Fe, iar liza leucocitelor poate să aibă semnificația unui factor de virulență, care împiedică fagocitoza. Majoritatea bacililor Gram negativi, inclusiv unele specii din microbiota normală gastrointestinală produc hemolizine:

Unele citolizine sunt fosfolipaze: *LLO* de *L. monocytogenes*, citolizinele produse de *Cl. perfringens* şi *Ps. aeruginosa* sunt fosfolipaze C, iar cea de *Corynebacterium pseudotuberculosis* este o fosfolipază D.

Fosfolipazele bacteriene cuprind un grup heterogen de proteine-enzime, care produc o varietate de efecte *in vivo* şi *in vitro*, de la alterări celulare minore în structura şi funcţia membranei citoplasmatice, până la efectul letal.

Listeriolizina O (LLO) produsă de *L. monocytogenes*, este singura toxină activată de gruparea tiol, a cărei activitate optimă este la pH acid din vacuola intracelulară, declanşând liza vacuolei.

LLO este singura toxină-enzimă din familia citolizinelor produsă de un patogen intracelular, care are rolul de a liza fagosomul. Acidifierea conţinutului vacuolar declanşează efectul litic al LLO, limitat la membrana fagosomului.

LLO este reprezentată de două *fosfolipaze C*, cu specificitate pentru fosfatidil-inozitol şi fosfatidil-colină.

Ieşirea agenţilor patogeni de *Rickettsia* din vacuola celulei este mediată de *fosfolipaze*, care fac parte din aceiaşi familie a citolizinelor.

Trypanosma cruzi invadează celulele, cu formarea vacuolelor acide intracelulare şi produce o toxină activă la pH 5,5, în stadiile intracelulare ale ciclului. Blocarea acidifierii reduce capacitatea *T. cruzi* de a liza vacuola şi de a trece în citosol.

Toxinele *termostabile* produse de *E. coli, Yersinia* sp., *Citrobacter freundii, Vibrio mimicus* acţionează printr-un mecanism comun: *activarea guanilat-ciclazei.*

Enterotoxinele sunt proteine secretate care se leagă de un receptor celular, intră în celulă şi produc creşterea nivelului AMPc.

O mare parte dintre enterotoxinele diareice se leagă la receptorii de natură glicosfingolipidică. Unele dintre aceste toxine sunt capabile să formeze canale permeabile pentru ionii de Ca, care pătrund în celulele epiteliului intestinal şi acţionează ca mesager secundar, modulând procesele de transport ionic. Toxinele care nu formează astfel de canale, determină, consecutiv, interacţiunii cu receptorii specifici, eliberarea altor mesageri secundari inductori ai secreţiei ionilor de Cl^-, care la rândul lor antrenează secreţia ionilor de Na^+ şi a apei, ca şi a altor anioni, ceea ce conduce la acumularea apei în lumenul inestinal, la dezechilibrarea balanţei hidro-electrolitice şi generarea diareii secretorii. Activitatea enterotoxinelor se poate evidenţia *in vitro* prin alungirea celulelor CHO (*Chinese hamster ovary*), rotunjirea celulelor Y-1 (*mouse adrenal tumor cells*) sau prin determinarea AMPc în celulele expuse acţiunii toxinei. O metodă independentă de celulele cultivate este ELISA (*enzyme-linked imunosorbent assay*). Receptorii specifici (de exemplu, gangliozidele GM_1) sunt fixate pe faza solidă pentru a lega enterotoxina, care poate fi detectată cu antiserul specific. În varianta alternativă a metodei ELISA, *sandwich*, faza solidă constă din fragmente F(ab')2 ale anticorpilor anti-toxină. Ambele metode au sensibilitate şi specificitate înalte. *In vivo*, pentru detectarea activităţii enterotoxinelor se foloseşte testul ansei ileale de iepure sau de şobolan.

Toxine cu activitate ADP-ribozilantă

Toxinele ADP-ribozilante au ca situs comun de legare NAD. Efectul lor constă în *transferul ADP-ribozei* de la NAD, pe care o leagă covalent, la proteine ale celulei eucariote, după reacţia globală:

$$NAD^+ + \text{Proteina ţintă} \text{ ----- } \text{ADP-riboza- Proteină} + \text{Nicotinamida} + H^+.$$

Unele dintre exotoxinele grupului se asociază cu proteine cu rol important în fiziologia celulară, care au capacitatea de a lega nucleotidele şi produc ADP-ribozilarea:

- unor proteine heterotrimerice care leagă GTP;
- unor proteine mici care leagă GTP;
- actinei;
- altor proteine ale celulei eucariote, neidentificate.

Exotoxinele ADP-ribozilante au trei tipuri de organizare A-B:

- proteine polipeptidice unice, cu componentele A-B legate covalent;

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

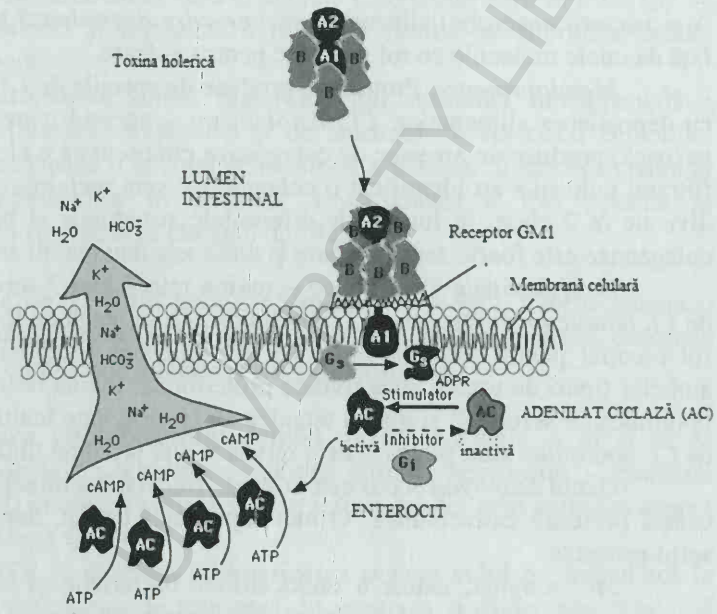
- complexe cu componente A-B localizate pe proteine separate, legate prin interacțiuni necovalente;
- complexe multiproteice cu componente A-B localizate pe două proteine separate.

Pentru unele exotoxine ADP-ribozilante, nu s-a evidențiat organizarea structurală de tip A-B.

Mecanismele activării exotoxinelor ADP-ribozilante, *in vitro,* cu organizare de tip A-B (fig. 51, 52) sunt:

- proteoliza parțială și generarea peptidului A activ cu activitate catalitică;
- reducerea legăturilor S-S;
- activarea alosterică de către nucleotide sau de către proteinele accesorii ale celulei eucariote.

Fig. 51. Mecanismul de acțiune al toxinei holerice.



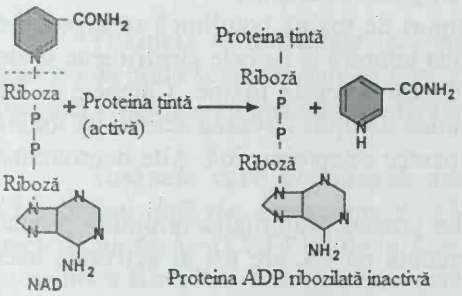


Fig. 52. Reprezentarea reacției de ADP-ribozilare.

Modelul de acțiune* a toxinelor ADP-ribozilante s-a elaborat pe baza proprietăților moleculare ale *toxinei difterice*, *exotoxinei A* de *Ps. aeruginosa* și *enterotoxinei* termolabile de *E. coli.*

* Reacțiile de ADP-ribozilare sunt de 4 tipuri: mono-ADP-ribozilare, poli-ADP-ribozilare, reacții de ciclizare a ADP-ribozei și reacții cu formarea O-acetil-ADP-ribozei. În aceste reacții NAD^+ are rolul de donor al ADP-ribozei, ceea ce impune sinteza sa constantă pentru a evita epuizarea rezervei celulare. NAD^+ se sintetizează din L-Trp și acid nicotinic, din nicotinamidă. Mono-ADP-ribozilarea este o reacție filogenetică veche, reversibilă, de modificare post-traducere, prin legarea covalentă a ADP-ribozei eliberată de NAD^+, de un aminoacid specific al unei proteine acceptoare, cu eliberarea simultană a nicotinamidei. În celulele eucariote, reacția are loc prin mecanism enzimatic sau neenzimatic, fiind identificată inițial ca mecanism patogen al câtorva toxine bacteriene: pertusică, holerică, unele toxine clostridiene, catalizate de mono-ADP-ribozil-transferaza (MART). Enzima s-a detectat la multe procariote, eucariote și la virusuri.

Reacția de ADP-ribozilare catalizată de MART este reversată de mono-ADP-ribozo-hidrolaze (MARH), prin hidroliza legăturii covalente dintre proteină și ADP-riboză. Coexistența în aceiași celulă a ADP-ribozil-transferazelor și a hidrolazelor sugerează că mono-ADP-ribozilarea proteinelor are rolul unui mecanism reglator reversibil. Cele mai studiate reacții de mono-ADP-ribozilare sunt catalizate de toxinele bacteriene. S-au identificat cel puțin 6 clase de MART cu specificitate de aminoacid: pentru Arg, Asp, Glu, Cis, His modificată etc. În celula eucariotă sunt ADP-ribozilate proteine extracelulare, citoplasmatice și nucleare (Hassa et al., 2006).

Toxina diftерică și exotoxina A de *Ps. aeruginosa* produc ADP-ribozilarea proteinelor mari care leagă GTP, cum ar fi factorul de alungire a catenei polipeptidice EF-2, la resturi de acid glutamic diferite (148 și respectiv 553), dar omologe din punct de vedere funcțional, deoarece ambele leagă inelul nicotinamidei din NAD printr-un mecanism dependent de UV.

Toxinele proteolitice

Proteazele sunt enzime care catalizează hidroliza legăturilor peptidice ale proteinelor. Ele sunt fie exopeptidaze, a căror acțiune este limitată la capetele –COOH sau $-NH_2$ ale proteinelor, sau

endopeptidaze – cele care clivează legăturile peptidice interne. Protezele sunt sintetizate de toate organismele şi îndeplinesc funcţii variate.

Protezele microbiene sunt predominant extracelulare şi pot fi clasificate în 4 grupe, în funcţie de restul catalitic esenţial la situsul activ: *serin-proteaze, cistein-proteaze* (tiol-proteaze), *aspartat-proteaze* şi *metaloproteaze*. Cele mai multe metaloproteaze sunt proteinele cu Zn. Zn este un component integral al multor proteine implicate în toate aspectele metabolismului.

La toate enzimele cu Zn, a căror structură cristalină este cunoscută, un atom de Zn catalitic are raporturi egale cu 3 resturi de aminoacizi ai proteinelor şi o moleculă activă de apă, iar atomii structurali de Zn au raporturi egale cu 4 resturi de cisteină.

Numeroase bacterii patogene (*Cl. perfringens, S. aureus, N. gonorrhoeae*, streptococii de grup A şi bacterii anaerobe) eliberează *enzime care degradează* ţesuturile gazdei sau au acţiune specifică faţă de unele molecule cu rol strategic pentru apărare.

Metaloproteaze. Proteazele produse de speciile de *Clostridium* s-au asociat cu patogenitatea şi cu deprecierea alimentelor. *Cl. histolyticum* – agentul cauzal al mionecrozei clostridiene (gangrena gazoasă) produce un amestec de colagenaze cunoscut ca o clostridio-peptidază A sau colagenază A. În filtratul culturii s-au identificat 6 colagenaze: sunt metaloproteaze cu Zn dependente de Ca, ce pot fi divizate în 2 clase, în funcţie de diferenţele structurale şi biochimice. Structura secundară a celor 6 colagenaze este foarte asemănătoare şi enzimele dau reacţii serologice încrucişate.

Neurotoxinele clostridiene – toxina tetanică şi 7 serotipuri de toxină botulinică sunt produse de *Cl. tetanicum* şi respectiv *Cl. botulinum*. Zn se leagă de toxina tetanică şi de cele clostridiene şi are rol esenţial pentru inhibiţia eliberării mediatorilor sinaptici de către aceste toxine. Catenele L ale ambelor tipuri de toxine au activitate proteolitică: toxina botulinică de tip E clivează actina, iar toxina botulinică de serotip B şi toxina tetanică au specificitate înaltă pentru sinaptobrevină. Alte neurotoxine de *Cl. botulinum* sunt proteaze care clivează alte proteine ţintă.

Genul *Staphylococcus* este o cauză frecventă a infecţiilor umane. Majoritatea tulpinilor produc câteva proteaze extracelulare. O metaloprotează cu Zn, dependentă de Ca, are rol în activarea unei serin-proteaze.

Str. sanguis, cauză a endocarditei bacteriene şi constituent al plăcii dentare, produce o protează extracelulară ce degradează IgA, caracterizată ca o metaloprotează. Enzima s-a identificat în leziunile parodontale produse de streptococi.

Proteaza care clivează IgA_1 este un factor major al virulenţei pentru *N. gonorrhoeae, N. meningitidis, H. influenzae, Str. pneumoniae, H. pylori, Serratia marcescens, EPEC, Sh. flexneri*,

La *V. cholerae*, enzima clivează IgA_1 la secvenţe specifice prolină-treonină sau prolină-serină în regiunea „balama" şi inactivează acţiunea specifică a anticorpului principal, protector al mucoaselor. IgA proteazele sunt sintetizate sub formă de precursori inactivi, care înainte de a fi secretaţi suferă un proces de autoproteoliză. Secreţia se realizează fără acumulare de intermediari în spaţiul periplasmic. Pentru translocaţia prin membrana externă, nu necesită prezenţa factorilor accesorii (sunt autotransportatori).

Pronaza P, un amestec comercial de proteaze produse de *Streptomyces griseus*, conţine câteva tipuri de proteaze, inclusiv câteva metaloproteaze neutre. Din pronaza P s-au purificat şi caracterizat 2 endopeptidaze cu Zn.

Ps. aeruginosa, un patogen oportunist ce produce infecţii fatale în special la persoanele imunosupresate, secretă numeroase produse extracelulare, două dintre ele fiind metaloproteaze: elastaza şi o protează alcalină. Elastaza este o metaloprotează cu Zn, ce degradează o varietate de proteine: elastina, laminina, fibrina, colagenul uman, câteva componente ale C şi Ig.

Legionella, un patogen facultativ, ce produce o pneumonie acută (boala legionarilor) secretă o metaloprotează neutră cu Zn. Enzima are multe proprietăţi care sugerează implicarea în patogeneză: este citotoxică şi este distructivă pentru ţesuturi.

Hemaglutinina de *V. cholerae* O1 este o protează neutră cu Zn, dependentă de Ca, care clivează câteva substraturi: mucina, fibronectina, lactoferina.

Aeromonas hydrophila, un patogen oportunist pentru om şi peşti, produce o varietate de substanţe extracelulare, inclusiv proteaze, ce condiţionează virulenţa. Metaloproteaza de *A. hydrophila* are activitate esterazică, dar nu citotoxică.

S. marcescens este un patogen oportunist. Secretă o metaloprotează, ca factor de virulență în infecțiile pulmonare. Enzima degradează fibronectina, colagenul şi câteva proteine serice.

Multe proteaze bacteriene extracelulare sunt sintetizate ca precursori cu un peptid suplimentar (propeptid), care este clivat şi nu se regăseşte în proteina matură secretată. Propeptidul are rolul de a menține proteaza în stare inactivă în interiorul celulei, protejând celula de efectul proteazei. Poate avea rol în plierea proenzimei într-o conformație necesară pentru activitate sau pentru secreție; poate ancora proteaza de membrană.

Mecanismul clivajului nu este cunoscut: s-a sugerat o prelucrare autoproteolitică.

Alte enzime degradative. C. perfringens produce *lecitinaza* care atacă lecitina (fosfatidil-colina), lipidul membranar major şi este hemolitică. *S. aureus* secretă *coagulaza*, care în asociație cu factorii sanguini produce coagularea plasmei şi formează o rețea de fibrină pe suprafața celulei bacteriene, cu efect protector față de fagocite.

Hialuronidazele, enzime ce hidrolizează acidul hialuronic din substanța fundamentală a țesutului conjunctiv sunt produse de stafilococi, streptococi şi de anaerobi. Streptococii hemolitici produc streptokinaza (fibrinolizina), ce activează o enzimă proteolitică a plasmei şi dizolvă coagulul plasmatic, favorizând diseminarea streptococilor în țesuturi. Streptokinaza a fost folosită în tratamentul infarctului miocardic acut, pentru a dizolva cheagul de fibrină.

Toxinele termostabile (secretate de *Yersinia pestis*, *Citrobacter freundii*, *Vibrio mimicus*) sunt polipeptide scurte bogate în Cys, care activează calea guanilat-ciclazei a celulei gazdă, deoarece prezintă omologie cu guanilina, activator endogen al guanilat-ciclazei intestinale.

Toxinele care acționează asupra citoscheletului celulei gazdă (toxinele A şi B de la *Clostridium difficile*, exoenzima de C_3 de la *C. botulinum*, factorii citoxici necrozanți – *cytotoxic necrotizing factor* (CNF) 1,2 de la *E. coli*) alterează polimerizarea actinei gazdei prin acțiunea asupra proteinelor Rho, Ras, Rac (proteine care leagă GTP).

Proteinele familiei Rho leagă GTP şi mediază polimerizarea *actinei* celulare, având rol în organizarea citoscheletului, în formarea veziculelor de transport, în creşterea şi diviziunea celulei şi desfăşurarea ciclului celular, participă la procesele de transducție a semnalelor, sunt implicate în endocitoza mediată de receptor şi secreție, controlează transcrierea, apoptoza şi transformarea celulară şi sunt *ținta acțiunii toxinelor* bacteriene.

Proteinele Rho sunt GTP-aze mici, controlate prin ciclul GTP-azei: sunt inactive în forma legată de GDP, dar se activează după trecerea GDP în GTP. Invers, hidroliza GTP legat, inactivează proteinele.

Exoenzimele şi moleculele înrudite

Pe lângă exotoxine, celulele bacteriene produc o serie de exoenzime implicate în liza celulară, denaturarea moleculelor care formează joncțiunile intercelulare, formarea şi dizolvarea cheagurilor sanguine: leucocidine (*Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp.) implicate în alterarea fagocitozei, hemolizine (*Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *C. perfringens*) care produc liza eritrocitară, coagulaze (*Staphylococcus* sp.) – implicate în coagularea fibrinogenului plasmatic, kinaze (*Str. pyogenes* – streptokinază, *S. aureus* – stafilokinază) ce produc denaturarea şi dizolvarea cheagului de fibrină, hialuronidaza implicată în hidroliza acidului hialuronic (*Clostridium* sp., *Pseudomonas* sp.), colagenaza implicată în denaturarea colagenului, factori necrozanți, hipotermici, lecitinaze, proteaze, siderofori.

Endotoxinele (LPS) sunt relativ termostabile şi mai puțin toxice decât exotoxinele, iar efectele lor sunt lipsite de specificitate. Din punct de vedere chimic, endotoxinele LPS sunt macromolecule complexe ce conțin fosfolipide şi polizaharide, toxicitatea lor este indirectă, iar activitatea biologică se manifestă la concentrații mari.

Termenii de "LPS" şi "endotoxină" sunt folosiți cu sensuri echivalente, dar LPS semnifică moleculele purificate, iar denumirea de "endotoxină" desemnează complexul format din LPS şi proteinele asociate din membrana externă.

BUAM CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

LPS sunt molecule amfifile, cu o parte *hidrofobă*, capabilă să se dizolve în lipidele membranare şi o regiune *hidrofilă*, care poate rămâne în faza apoasă. O primă treaptă a acţiunii LPS o constituie interacţiunea dintre molecula amfifilă şi suprafaţa celulei sensibile. Molecula LPS poate fi inserată în membrana celulei prin jumătatea hidrofobă sau se ataşează de receptorii membranari prin jumătatea hidrofilă. O modalitate distinctă a interacţiunii LPS cu macrofagele, este aceea mediată de o proteină plasmatică de fază acută denumită LBP (*LPS binding protein*).

Sursele majore de endotoxine sunt următoarele: 1) septicemia cu bacterii Gram negative; 2) bacterii originare în microbiota intestinală, datorită leziunilor mucoasei.

O particularitate a LPS, în contrast cu acţiunea exotoxinelor, constă în aceea că simptomele toxice nu se datorează acţiunii lor directe asupra celulelor sensibile, ci sunt mediate, în mare parte, de citokinele sintetizate *de novo* de macrofage, ca răspuns la LPS.

LPS sunt molecule foarte *imunogene* prin stimularea nespecifică, policlonală a limfocitelor B. Anticorpii au specificitate faţă de polizaharidul extern şi precipită LPS, dar nu neutralizează efectele lor toxice. Răspunsul imun este de tip primar, deoarece molecula de LPS este un antigen timo-independent, cu grupări antigenice repetitive.

Lipidul A are proprietăţi imunogene, iar anticorpii specifici reacţionează încrucişat cu lipidul A al altor endotoxine, datorită uniformităţii structurii sale.

Antigenul polizaharidic, obţinut prin hidroliza acidă îşi păstrează proprietatea de specificitate, dar nu este imunogen, având proprietatea de haptenă.

Efectele endotoxinei se manifestă atât în stare fizică legată de celulă, cât şi după ce a fost eliberată prin moartea şi liza celulei sau printr-un proces de "înmugurire", care nu influenţează viabilitatea acesteia. Din această cauză, cele două stări, *endotoxemia* şi *bacteriemia* pot să coexiste sau să se manifeste în etape distincte ale procesului infecţios. Proprietăţile endotoxice ale celulelor bacteriene, vii sau omorâte, sunt aceleaşi cu ale preparatului de endotoxină. În organismul infectat nu există o corelaţie lineară între nivelul bacteriemiei şi al endotoxemiei şi respectiv, intensitatea efectelor endotoxice. Capacitatea organismului de a detoxifica este un factor modulator esenţial al manifestărilor endotoxice. Glucocorticoizii au efect protector anti-endotoxic, probabil prin modificarea permeabilităţii capilare.

Endotoxinele nu au rol în colonizarea şi penetrarea suprafeţei mucoase, deoarece lipidul A are o localizare profundă în membrana externă. Tulpinile invazive şi neinvazive de *Salmonella* produc cantităţi similare de endotoxină. Endotoxina are rol în iniţierea infecţiei, probabil prin inducerea unei scăderi tranzitorii a capacităţii de apărare a gazdei, prin întârzierea declanşării unui răspuns inflamator.

Dozele mici de toxină măresc rezistenţa organismului la infecţiile bacteriene şi virale prin stimularea activităţii fagocitare şi respectiv, a producerii de interferon.

Endotoxinele iniţiază calea alternativă a activării complementului, dar efectul nu este bacteriocitoliza, deoarece reacţia se produce la distanţă de membrana externă. *In vitro* au efect mitogenic asupra limfocitelor B. LPS au proprietăţi adjuvante, deoarece stimulează răspunsul imun specific faţă de un antigen administrat simultan.

Dozele mari de endotoxine determină o serie de manifestări patologice sistemice, nespecifice:

- *hipertermie* (febră), prin acţiunea lor asupra centrilor termoreglării, chiar după administrarea unor doze minimale. Inducerea febrei este semnul marcant al toxicităţii LPS. Febra este efectul indirect al acţiunii LPS asupra macrofagului, care secretă câteva citokine: IL-1, TNF β, IFN γ, cu acţiune directă asupra hipotalamusului. Starea febrilă se instalează brusc, este monofazică, mediată de prostaglandine;
- *leucopenie* urmată de leucocitoză. Efectul se exercită direct şi rapid asupra leucocitelor. Ele părăsesc patul vascular şi se retrag aproape instantaneu în plămân şi în alte ţesuturi, în proporţie de circa 60%. Dupa circa 4 ore, numărul leucocitelor circulante creşte peste limitele normale. Creşte numărul hematiilor circulante, datorită eliberării în circulaţie a rezervelor celulare din centrele de formare şi depozitare a eritrocitelor;
- *modificări cardiovasculare*: legarea endotoxinei de celulele hepatice sau de alte celule induce eliberarea rapidă a aminelor biogene (histamina, serotonina) şi a peptidelor (bradikinina) din depozitele celulare. Aminele produc o hipertensiune tranzitorie, urmată

de hipotensiune severă, hipovolemie şi formarea cheagurilor vasculare de fibrină. Endotoxinele activează sistemul de coagulare sanguină;

– *efecte metabolice*: endotoxina inhibă sistemele enzimatice ale gluconeogenezei şi ale sintezei glicogenului.

Din punct de vedere clinic, dozele mari de endotoxină produc următoarea secvenţă de modificări: frison, febră, somnolenţă, dispnee, modificări ale dinamicii tranzitului intestinal, diaree sanguinolentă, hiperglicemie incipientă urmată de hipoglicemie, paralizie, comă, moarte. Acest tablou de modificări se succede în circa 24 de ore după injectarea preparatului la animalele sănătoase şi corespund stării de *şoc endotoxic*, consecinţă a endotoxemiei (fig. 53). Endotoxemia este rezultatul supraîncărcării celulelor cu rol de apărare, ca urmare a revărsării endotoxinelor în circulaţie. Starea de endotoxemie nu este totdeauna urmată de şoc şi moarte. Nu se cunosc cauzele marilor diferenţe de răspuns şi reactivitate, la starea de endotoxemie. Şocul fatal este consecinţa interacţiunii endotoxinei cu sistemul de coagulare a sângelui, pe care îl activează şi îl amplifică. S-a emis ipoteza că instalarea şocului ireversibil este favorizată de absorbţia în sânge a endotoxinelor produse de microbiota intestinală. În mod normal, mecanismele de detoxifiere a organismului sunt eficiente, dar starea de şoc se instalează consecutiv diverselor tulburări funcţionale, care împiedică o reactivitate optimă faţă de infecţia cu bacterii Gram negative.

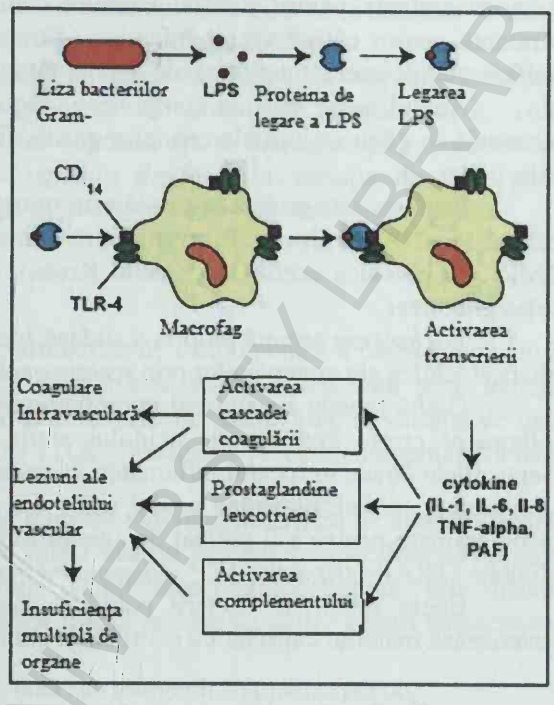


Fig. 53. Efectele patologice ale endotoxinelor (după Kaiser, 2005)

Şocul este consecinţa unui *răspuns inflamator* intens la produsele de origine microbiană. Inflamaţia este reacţia de mobilizare a componentelor humorale (anticorpi, complement) şi celulare (neutrofile, macrofage, limfocite T) ale sistemului imunitar. Celulele activate, dar în special celulele seriei monocit/macrofag iniţiază sinteza unei cantităţi mari de mediatori specializaţi: citokine, chemokine, mediatori lipidici. Mediatorii alterează permeabilitatea vasculară şi fluxul sanguin. Creşte aderenţa fagocitelor la celulele endoteliale şi se intensifică migrarea leucocitelor în ţesut. De cele mai multe ori, procesul inflamator are ca rezultat eliminarea agentului infecţios, sterilizarea focarului şi regenerarea tisulară. Răspunsul biologic net inflamaţiei este determinat de raportul mediatorilor proinflamatorii şi anti-inflamatorii. Şocul este consecinţa unui dezechilibru major în favoarea mediatorilor proinflamatorii. TNF şi IL-1 sunt consideraţi a fi cei mai importanţi mediatori ai răspunsului inflamator. *In vivo*, acţiunea lor este sinergică, într-o infecţie locală sau sistemică. Blocarea ambelor citokine cu anticorpi specifici diminuă mult severitatea inflamaţiei.

Porphyromonas gingivalis, H. pylori şi *Chl. trachomatis*, asociate cu maladii inflamatorii cronice, conţin LPS cu activitate biologică scăzută, adică stimulează puţin sinteza de mediatori ai inflamaţiei. Aceste LPS au mai puţini acizi graşi şi grupări fosfat ataşate de lipidul A.

Starea de şoc este indusă de bacteriemia cu bacterii Gram negative şi se datorează eliberării masive a endotoxinei, spontană sau consecutivă lizei bacteriene. Unii pacienţi trataţi cu antibiotice eficiente pot sucomba datorită şocului produs de eliberarea masivă a endotoxinelor din bacteriile omorâte. Antibioticele β-lactamice sunt cele mai eficiente pentru eliberarea endotoxinei în exces. Capacitatea lor de a elibera endotoxina este dependentă de afinitatea de legare la diferite proteine ale membranei externe.

Capacitatea de a elabora toxine nu este limitată la bacteriile patogene propriu-zise. Numeroase saprobacterii produc substanţe toxice, uneori foarte puternice (de exemplu, toxina botulinică produsă de *Cl. botulinum*). Toxigenitatea bacteriană variază la diferitele tulpini ale aceleiaşi specii şi este dependentă de condiţiile de mediu.

4.6. Proprietăţi metabolice particulare implicate în virulenţa bacteriană

Multe bacterii patogene şi comensale folosesc acizii sialici ca surse de C, N, energie şi de zaharuri aminate pentru sinteza peretelui celular. Metabolizarea acidului sialic este un factor de virulenţă pentru câţiva agenţi infecţioşi. Cunoaşterea mecanismelor metabolismului acidului sialic unifică studiul interacţiunilor gazdă-agenţi patogeni ai unor maladii infecţioase invazive.

Acidul sialic este un component ubiquitar al glicoproteinelor vertebratelor şi are o poziţie terminală în glicoconjugatele celulelor gazdă, fiind molecula care mediază interacţiunea celulă-agent infecţios.

După ce este preluat în celulă prin transportori de mare afinitate, acidul sialic poate fi clivat şi rezultă ManNAc şi piruvat. Piruvatul intră în metabolismul intermediar ca fosfo-enol-piruvat (pe calea EMP) sau pe calea acetil-CoA (ciclul Krebs), iar ManNAc este convertit la fructozo-6P şi intră în calea glicolizei.

V. cholerae secretă propria sialidază (neuraminidază) – o glicohidrolază ce clivează legăturile glicocetozidice ale enterocitelor prin reacţie exohidrolitică, eliberând acidul sialic pentru catabolism.

O altă funcţie a sialidazei microbiene este modularea imunităţii înnăscute a gazdei. În focarul inflamator creşte concentraţia acidului sialic, pe o cale independentă de sialidaza microbiană. Neutrofilele atrase în focarul inflamator, stimulate de IL-8, mobilizează sialidaza intracelulară proprie la suprafaţa celulei, eliberând acidul sialic din moleculele proprii şi din glicoproteinele moleculelor înconjurătoare pentru a fi preluat de agenţii infecţioşi care posedă mecanisme transportoare de înaltă afinitate (TRAP= *tripartite ATP-independent periplasmic transporters*).

Unele specii de bacterii patogene sintetizează acidul sialic: *E. coli* K_1, *N. meningitidis* sintetizează material capsular cu o structură chimică identică: poli-acid sialic.

4.7. Reglarea expresiei factorilor de virulenţă

La bacterii au fost descrise o serie de mecanisme implicate în reglarea şi coordonarea expresiei factorilor de virulenţă şi patogenitate:

- *sistemele de reglare cu 2 componente* (*quorum sensing and response*) cu o distribuţie ubiquitară în lumea bacteriană (*Erwinia carotovora, E. chrysanthemi, E. stewartii, E. herbicola, Ps. aeruginosa, Ps. fluorescens, Ps. syringae, Ps. solanaceum, Ps. aureofaciens, Chromobacter violaceum, Rhizobium meliloti, R. leguminosarum bv. phaseoli, R. leguminosarum bv. viciae, Photobacterium (Vibrio) fischeri, Aeromonas hydrophila, Vibrio anguillarum, V. harveyi, V. cholerae, Serratia liquefaciens, S. marcescens, Y. Enterocolitica, E. coli, Enterobacter agglomerans, Caulobacter crescentus, Brucella abortus, Streptomyces sp., Mixoxoccus xanthus, B. subtilis, S. aureus, Str. pneumoniae, Str. mutans, Str. pyogenes, Lactococcus lactis, Enterococcus faecalis, A. tumefaciens*);
- *familia activatorilor transcrierii Ara C* – proteine ce conţin motive *helix-turn-helix*, care se leagă la secvenţe specifice de ADN în *amonte* de genele reglate şi transcrise (ex. Vir F la *S. flexneri*, reglatorul proteinelor Yops la *Yersinia*, al exoenzimelor A şi S de la *Ps. aeruginosa*;
- *reglatorii transcrierii Lys R* – proteine care se leagă la molecula de ADN, în aval de genele reglate şi transcrise (ex. activatorul Spv R de la *Salmonella*, localizat plasmidial, reglează expresia altor factori de virulenţă (Spv A → Spv D), jucând un rol important în supravieţuirea pe termen lung la şoarece);
- *sistemele reglare Fur (feric uptake regulator)* – proteină care leagă ADN numai în prezenţa Fe, iar legarea sa duce la represia tuturor genelor situate în aval. În absenţa Fe, genele sunt transcrise (astfel condiţiile limitative în ceea ce priveşte concentraţia ionilor de Fe pot derepresa expresia factorilor de virulenţă);
- *topologia ADN* – enzime care influenţează gradul de supraspiralizare sau proteine *histon-like* implicate în exprimarea unor factori de virulenţă: factori de invazie la *S. typhimurium*, exprimarea pililor la *Neisseria sp.*, formarea corpilor elementari la *Chl. trachomatis*);
- *factorii alternativi tip* σ – sunt reglatori ai transcrierii, grupaţi în două familii de proteine, σ^{70} şi σ^{54}, care conferă specificitate de recunoaştere a promotorilor de către

ARN-polimerază, contribuie la separarea catenelor de ADN complementare şi la iniţierea transcrierii, fiind implicaţi în expresia factorilor de virulenţă la numeroase specii bacteriene (*Salmonella* sp., *B. bronchiseptica*; *Bacillus* sp.); în prezent, blocarea funcţionării mecanismelor de reglare prin intermediul factorilor σ constituie o nouă abordare în strategiile anti-patogenice (Kazmierczak şi colab., 2005);
- *modificări epigenetice – metilarea post-replicativă* a ADN la nivelul *adeninei*, influenţează virulenţa diferiţilor agenţi patogeni ai omului şi animalelor: *E. coli, Salmonella* sp., *Vibrio* sp., *Yersinia* sp., *Haemophilus* sp. şi *Brucella* sp. Fenomenul ce implică metilarea ADN la bacterii este *variaţia de fază.* În variaţia de fază, gena funcţională se caracterizează prin alternanţa între activitate (*on*) şi inactivitate (*off*).

4.8. Evoluţia bacteriilor patogene

Bacteriile trebuie să se adapteze permanent schimbărilor de mediu pentru a putea supravieţui, elaborând în acest scop strategii evolutive bazate pe diversitatea genetică, realizată prin: *mutaţii punctiforme* (deleţii), *rearanjări genomice* (reversibile sau ireversibile) (de exemplu, variaţia de fază la *Salmonella, Moraxella*), *transferul orizontal de gene* (TOG) localizate pe elemente genice mobile (plasmide, fagi, insule de patogenitate).

TOG conduce la *microevoluţie* (apariţia rapidă a noilor variante, în termen de zile/săptămâni, aşa cum este cazul insulelor de patogenitate care pot suferi inserţii sau deleţii specifice de sit care generează rezistenţa la antibiotice) sau la *macroevoluţie* (stabilizarea noilor genotipuri prin mutaţii pato-adaptative şi apariţia variantelor noi, generarea noilor specii, emergenţa noilor genuri bacteriene).
Mutaţiile punctiforme pot apărea la nivelul:
- regiunii promotor (de exemplu, variaţia de fază sau antigenică la meningococ, *Mycoplasma, E. coli)*;
- extremităţilor 5' ale genelor de virulenţă;
- genelor reglatoare (factorul alternativ σ);
- genelor structurale – mutaţii pato-adaptative care permit unei bacterii să devină mai bine adaptată la o anumită nişă. Conferind un avantaj adaptativ, mutaţiile se stabilizează în populaţiile bacteriene. Dacă bacteriile mutante pot supravieţui chiar şi în nişele naturale, atunci se va selecta o subpopulaţie de bacterii virulente. Mutaţiile genelor structurale permit adaptarea bacteriilor patogene în absenţa dobândirii unor gene suplimentare. Patogenii oportunişti pot suferi diferite mutaţii pato-adaptative care să favorizeze adaptarea la condiţiile gazdei.

Deleţiile reprezintă unul dintre principiile majore ale plasticităţii genomice. De exemplu, la *Streptomyces*, emergenţa noilor variante are loc prin deleţia unor segmente de 800 kpb. La *B. subtilis* excizia fragmentelor de ADN din regiunea codificatoare duce la apariţia unor noi variante. Deleţia permite integrarea sau excizia plasmidelor, integrarea specifică de sit sau deleţia secvenţială a insulelor de patogenitate.

Insulele de patogenitate sunt unităţi genetice distincte, flancate de secvenţe repetate, cu un conţinut de GC diferit de cel al cromosomului bacterian, de dimensiuni mari (> 30 Kpb) care prezintă mai multe gene de virulenţă, asociate cu gene pentru ARNt şi/sau cu secvenţe de inserţie. Insulele de patogenitate sunt prezente la tulpinile patogene şi absente sau puţin reprezentate la tulpinile nepatogene, sunt instabile şi prezintă gene „mobile" (SI, integrare, transpozaze, origini de replicare plasmidială). Insulele de patogenitate se integrează pe cromosomul bacterian la nivelul genelor pentru ARNt.

Evenimentele de recombinare specifică de sit (deleţii, inversii, amplificare genică, rearanjări ale ADN bacterian mediate de secvenţe de inserţie) conduc la apariţia fenomenului de *variaţie antigenică* (sinteza *pililor* la *N. gonorrhoeae*, *capsulei* la *Str. pneumoniae*), sau la *apariţia unor noi mecanisme de rezistenţă* (rezistenţa la penicilină la *Str. pneumoniae*).

Transferul orizontal al genelor (plasmide, fagi, insule de patogenitate) asigură diseminarea genelor codificatoare pentru factori de virulenţă (adezine, toxine, capsulă, invazine, rezistenţa la antibiotice).

Caracterizarea genelor de patogenitate/virulență se poate realiza experimental prin:

- construcția mutanților (mutații non-letale, mutații monogenice, stabile);
- inserție de Tn care are drept consecință inactivarea genică și permite caracterizarea funcționalității *in vitro* și respectiv, *in vivo*);
- localizarea unei gene inactivate prin hibridizare, caracterizarea numărului de SI prin southern blot, caracterizarea secvențelor flancate prin RFLP, secvențiere;
- clonare și expresia genei într-un vector heterolog pentru identificarea unei posibile funcții ale respectivei gene;
- sonde intragenice;
- primeri de amplificare.

4.9. Relația dintre patogenitate și parazitism

Relațiile dintre bacteriile patogene și organismele gazdă sunt foarte variabile. Multe bacterii infecțioase pot să se dezvolte în mediile naturale și să intre în competiție cu microorganismele indigene. Alteori însă, bacteriile patogene sunt strict dependente de o gazdă animală pentru perpetuarea lor în natură, dar pot supraviețui perioade relativ lungi în mediile naturale.

Dependența absolută de gazdă are mai multe cauze, cea mai probabilă fiind determinată de existența unor exigențe nutriționale complexe.

Modul de viață parazitară implică pierderea funcțiilor ce asigură supraviețuirea în mediile naturale. Evoluția dependenței de gazdă tinde spre o adaptare cât mai eficientă a creșterii *in vivo*. Situația extremă a acestei adaptări este toleranța reciprocă ce evoluează în direcția unei simbioze.

Bacteriile patogene cel mai bine adaptate sunt cel mai adesea capabile de creștere intracelulară, iar cele oportuniste sau facultativ parazite au o localizare extracelulară. Pe această bază s-au descris trei categorii de bacterii parazite: parazite extracelulare, facultativ intracelulare și obligat intracelulare.

Bacteriile parazite extracelulare colonizează în mod normal pielea și mucoasele, deși unele specii invadante se pot dezvolta în sânge și în limfă. Supraviețuirea lor *in vivo* este condiționată de rezistența la fagocitoză. Ele colonizează zone inaccesibile fagocitozei sau sintetizează substanțe cu acțiune antifagocitară: leucocidine și polizaharide capsulare.

Leucocidinele sunt factori de virulență care omoară fagocitele profesioniste. Au fost descrise la *S. aureus, Str. pyogenes, Ps. aeruginosa.*

Multe bacterii patogene sunt omorâte curând după ce au fost ingerate de neutrofile sau de macrofage. Unii agenți patogeni evită fagocitoza sau acțiunea mecanismelor microbicide ale fagocitelor. De exemplu, *S. aureus* are *proteina A* pe suprafața sa, care leagă regiunea Fc a IgG. *Capsula* (la *Str. pneumoniae*) exercită acțiune antifagocitară pe mai multe căi:

- este o barieră fizico-chimică, împiedicând legarea factorilor opsonizanți pe suprafața celulei bacteriene;
- blochează contactul celulei bacteriene cu receptorii fagocitelor;
- are efect chimiotactic negativ.

Puține bacterii (*Capnocytophaga* sp., *Bordetella* sp.) secretă factori solubili sau toxine cu efect inhibitor al chimiotaxiei leucocitelor și inhibă fagocitoza.

Str. pyogenes (grup A) are *proteina M* de suprafață, cu efect antifagocitar; *N. gonorrhoeae* posedă *pili* cu același efect.

Heterogenitatea antigenică a structurilor de suprafață este un factor major al virulenței multor agenți patogeni: s-au identificat peste 90 de variante antigenice ale polizaharidului capsular la *Str. pneumoniae* și peste 150 de variante ale proteinei M la streptococii de grup A. Consecința heterogenității antigenice este că organismul gazdă se apără față de varianta antigenică infecțioasă, dar rămâne sensibil față de celelalte variante.

Bacteriile patogene parazite *facultativ intracelular* se multiplică atât extracelular, dar pot pătrunde și în celulele gazdei. Unele se multiplică în fagocitele "neprofesioniste" sau în alte tipuri de celule, dar nu și în macrofage (de exemplu, *Shigella* sp., *N. gonnorhoeae*). Altele sunt capabile să se

multiplice în fagocitele "neprofesionoiste", dar şi "profesioniste". Ele rezistă atacului enzimelor litice în vacuolele fagosomilor. Rezistența bacteriană se datorează prezenței lipopolizaharidelor pe suprafața celulei.

Bacteriile parazite *obligat intracelulare* se dezvoltă exclusiv în celulele vii, dar pot supraviețui şi în mediile extracelulare.

4.10. Microorganismele oportuniste

Sub această denumire sunt reunite bacterii, microfungi, protozoare care produc infecții la gazde compromise sub raportul capacității de apărare.

Conceptul de "microorganism oportunist" este ambiguu, deoarece definiția nu exclude producerea infecției la o gazdă, ale cărei capacități de apărare sunt depăşite de doza infectantă sau de virulența crescută a microorganismelor.

Pentru microorganismele oportuniste, starea de funcționalitate a mecanismelor de apărare este determinantă în ceea ce priveşte rezultatul interacțiunii sale cu gazda. Microorganismele oportuniste nu au mijloacele eficiente pentru a depăşi mecanismele de apărare ale gazdei. Oportuniştii pot fi foarte adaptați să producă infecții, dar datorită situsului preferat de creştere (de exemplu, suprafața mucoasei) şi a unor condiții preferabile de creştere (de exemplu, condiții de microaerofilie), rareori au şansa să producă procesul patologic.

După von Graevenitz (1977) microorganismele oportuniste pot produce trei tipuri de infecții:

- exclusiv la gazdele compromise imunologic (*Mycobacterium avium*, *Corynebacterium equi*);
- cu o frecvență mai mare la gazdele imuno-compromise (*Staphylococcus* sp., *Salmonella* sp.);
- mai severe la gazdele imuno-compromise (*Mycoplasma pneumoniae, Salmonella* sp.).

Microorganismele care produc infecția clinică numai la gazde neimunizate (de exemplu, *C. diphteriae*) nu sunt oportuniste.

Microorganismele oportuniste formează o categorie distinctă de a celor saprobionte. Cele saprobionte trăiesc pe materia organică în descompunere şi nu intră în competiție cu microbiota normală a organismului. *Cele oportuniste pot fi saprobionte, nu fac parte din microbiota normală, dar intră în competiție cu microbiota normală a organismului.* Unii membri ai acesteia pot produce infecții oportuniste.

Pentru ca un agent să fie încadrat în categoria microorganismelor oprtuniste, von Graenevitz ia în considerație următoarele condiții:

- microorganismul să fie izolat de mai multe ori din leziuni clinice, de la gazde cu deficit la funcției imuntare;
- sa fie mai frecvent prezent şi izolat de la gazde compromise imunologic, decât de la restul populației;
- prezența sa într-un proces patologic să nu se datoreze unor cauze indirecte.

Ps. aeruginosa supraviețuieşte în diferite soluții, în care substanțele nutritive se găsesc în cantități infime şi chiar în soluțiile dezinfectante. Organismul uman, în mod obişnuit, împiedică colonizarea pseudomonadelor, dar la persoanele imunocompromise şi în rănile provocate de arsuri sau de traumatisme, ca şi în plămânii pacienților cu fibroză chistică, *Ps. aeruginosa* este adesea prezent.

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. EVOLUŢIA PROCESULUI INFECŢIOS

5.1. Etapele procesului infecţios

O primă etapă a procesului infecţios constă în pătrunderea şi colonizarea ţesuturilor gazdei la poarta de intrare în organismul gazdă (tabelul 4), ceea ce presupune mobilizarea unor strategii microbiene care să depăşească bariera de apărare anti-infecţioasă cutaneo-mucoasă.

Intoxicaţia botulinică, fără colonizarea organismului gazdă reprezintă o excepţie. *Cl. botulinum* se multiplică în alimentele conservate şi produce toxina, care, odată ingerată cu alimentele contaminate, determină intoxicaţia.

Tabelul 4.

Porţile de intrare pentru diferiţi agenţi patogeni în organismul uman

	Patogen	Boala	Perioada de incubaţie
Tractul respirator	*Str. pneumoniae*	Pneumonia pneumococică	Variabilă
	M. tuberculosis	TBC	Variabilă
	B. pertussis	Tusea convulsivă	12–30 zile
	Virusul *influenza*	Gripa	18–36 h
	Virusul *rujeolei (Morbillivirus)*	Rujeola	11–14 zile
	Virusul *rubeolei (Rubivirus)*	Rubeola	2–3 săpt.
	Virusul Epstein-Barr (Lymphocryptovirus)	Mononucleoza infecţioasă în Europa, limfomul Burkitt în Africa ecuatorială, carcinom nazo-faringian în Japonia	2–6 săpt.
	Varicella zoster (Varicellavirus)	Varicela	14–16 zile
	Histoplasma capsulatum	Histoplasmoza	5–18 zile
Tractul gastro-intestinal	*Shigella*	Dizenteria bacilară	1–2 zile
	Brucella	Bruceloza/febră ondulantă	6–14 zile
	S. enteritidis	Salmoneloze	7–22 h
	S. tyhphimurium		
	S. cholerasuis		
	S. typhi	Febra tifoidă	14 zile
	Virusul *hepatitei A*	Hepatita acută A	15–50 zile
	Paramyxovirus	Oreion	2–3 săpt.
	Trichinella spiralis	Trichineloză	2–28 zile
Tractul genitor-urinar	*N. gonorrheae*	Gonoree	3–8 zile
	T. pallidum	Sifilis	9–90 zile
	Chl. trachomatis	Uretrită negonococică	1–3 săpt.
	HSV – 2	Herpes	4–10 zile
	HIV	SIDA	10 ani
	Candida	Candidoză	
Piele sau ruta parenterală	*Cl. perfringens*	Gangrenă gazoasă	1–5 zile
	Cl. tetani	Tetanus	3–21 zile
	Ricketssia ricketssii	Febra Munţilor Stâncoşi	3–21 zile
	Virusul *hepatitei B (Hepadnavirus)*	Hepatita B	6 săpt.–6 luni
	Virusul *rabic (Lyssavirus)*	Rabia	10 zile–1 an
	P. malariae	Malaria	2 săptămâni.

La nivelul tractului respirator superior, intestinului, tractului uro-genital, microorganismele patogene intră în competiţie cu microbiota rezidentă, care exercită în mod direct şi indirect activitate antimicrobiană (prin privarea de substanţe nutritive, ocuparea siturilor de legătură de la suprafaţa mucoasei, producerea substanţelor inhibitoare). Efectul protector al microbiotei rezidente este contracarat de microorganisme prin intermediul unei varietăţi de factori, care le conferă capacitatea de a invada gazda, de a se răspândi în ţesuturi şi de a supravieţui mecanismelor de apărare ale acesteia.

Dacă agenţii patogeni rămân localizaţi la poarta de intrare în cursul întregului proces infecţios se produce *infecţia localizată* (neinvazivă). O formă particulară a infecţiei localizate este infecţia de focar, caracterizată de constituirea unui *focar de inflamaţie*, adică o reacţie de apărare locală a organismului, cu mobilizarea şi aglomerarea leucocitelor. Rezultatul inflamaţiei este *supuraţia* la nivel cutanat şi la nivelul mucoaselor respiratorie, digestivă, urinară, genitală. Febra reumatismală este

considerată ca o infecție tipică "de focar", în timpul căreia streptococul localizat la poarta de intrare (amigdale) elimină substanțe cu efect alterativ și alergizant.

În alte cazuri, microorganismele cantonate la poarta de intrare secretă toxine care disemineză sistemic și își manifestă acțiunea la distanță (de exemplu, *C. diphteriae, Cl. tetani*) (fig. 54). În aceste cazuri, infecția locală are caracterul unei toxiinfecții. De exemplu, *Cl. tetani* se multiplică în plaga anaerobă provocată de rănire, iar toxina ajunge prin difuzie axonală retrogradă, la motoneuronii din coloanele anterioare ale măduvei, unde își exercită efectul. În mod similar, *C. diphteriae* se multiplică pe mucoasa faringiană, iar toxina determină efecte patologice la distanță, asupra fibrei musculare cardiace, celulei nervoase sau glandelor suprarenale.

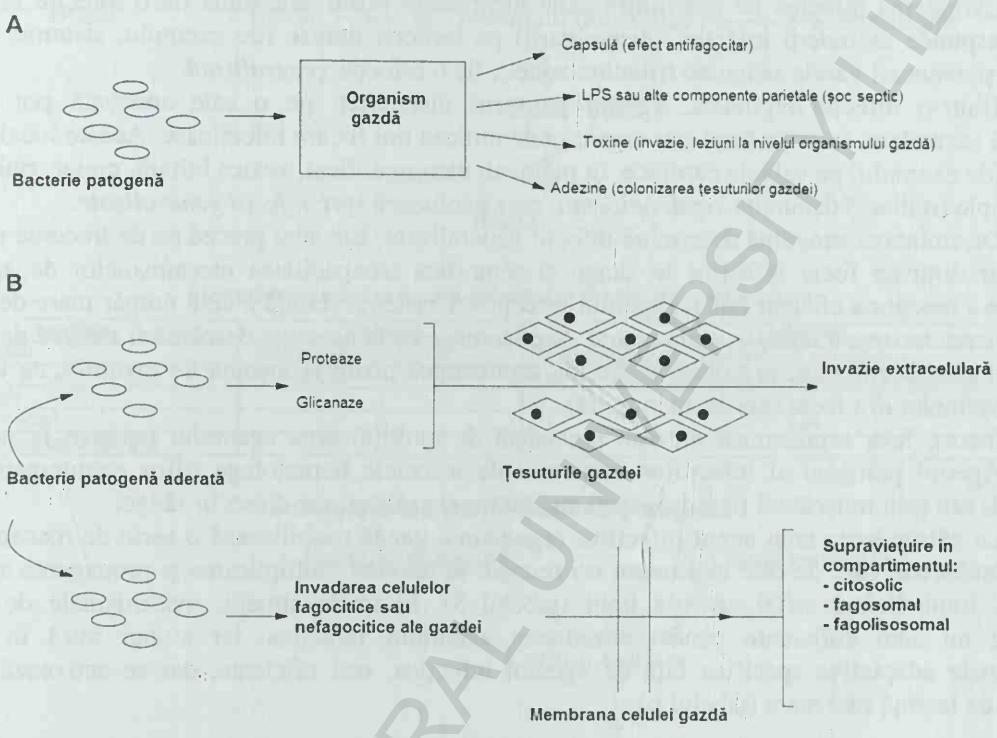


Fig. 54. Evoluția sistemului gazdă – agent infecțios (după Wilson et al., 2002).

Toxiinfecțiile alimentare sunt rezultatul consumului alimentelor infectate (carne, lapte, ouă) provenite de la animalele bolnave sau contaminate în timpul manipulării. De exemplu, *Salmonella* sp. și *S. aureus* se multiplică excesiv în alimente (carne) și concomitent se acumulează endotoxine și respectiv enterotoxine.

Consumul alimentelor echivalează cu ingestia unei culturi bacteriene. Concomitent cu efectele toxinelor se manifestă și procesul infecțios inițiat de celulele vii ingerate, de colonizare a mucoasei intestinale.

Unii agenți patogeni, după o perioadă inițială de multiplicare la poarta de intrare, se răspândesc la distanță pe diferite căi generând *infecțiile invazive*:

- prin *contiguitate*, tipică agenților infecțioși cu multiplicare intracelulară (virusuri, rickettsii). După eliberare prin necroza celulei, prin înmugurire, prin permeabilizarea sau ruperea membranei, agenții infecțioși infectează celulele sensibile învecinate;
- prin *continuitate*, în cazul agenților patogeni care se multiplică într-un țesut prevăzut cu un sistem canalicular. De exemplu, infecțiile respiratorii progresează de la nivelul tractului respirator superior spre bronhii (bronșite), țesutul pulmonar (pneumonii), pleure (pleurite), în timp ce la nivelul tractului urogenital și a căilor biliare, infecția progresează ascendent, de la nivelul uretrei spre rinichi. De la nivelul apendicelui, agentul diseminat poate produce peritonita;
- *pe cale limfatică*. De la nivelul focarului infecțios primar, agenții infecțioși sunt preluați de curentul limfatic. Consecința imediată este inflamarea vaselor limfatice și a

ganglionilor regionali (limfadenita). Infecția poate progresa prin deversarea limfei în sânge, rezultatul fiind *bacteriemia* sau *viremia*.

Bacteriemia semnifică prezența unui număr mic de bacterii în torentul circulator, pentru o perioadă strict limitată de timp. Sistemele de apărare, în special sistemul fagocitar elimină bacteriile circulante. Bacteriemia este consecutivă proceselor infecțioase acute pulmonare, intervențiilor chirurgicale, extracției dentare, absorbției intestinale și chiar periajului dentar. În sânge, cu rare excepții (bacilul cărbunos, al pestei) bacteriile nu se multiplică.

De aceea, prezența lor în sânge semnifică o eliberare dintr-un focar de infecție, atât de abundentă, încât, temporar, depășește capacitatea protectoare a mecanismelor de apărare a organismului.

Extinderea infecției pe una dintre căile menționate poate determina fie o infecție *regională*, care corespunde extinderii infecției (diseminarii) pe teritorii întinse (de exemplu, sistemul limfatic regional și eventual vasele sanguine tributare zonei), fie o infecție *generalizată*.

Dintr-o infecție regională, agenții patogeni diseminați pe o cale adecvată pot dobândi localizări secundare, în orice țesut sau organ, unde inițiază noi focare infecțioase. Aceste localizări pot fi unice (de exemplu, pe valvele cardiace, în plămâni, meninge, ficat, vezica biliară, creier, rinichi etc.) sau multiple (miliare) denumite *septicopioemii*, care evoluează spre *infecții generalizate*.

Diseminarea sanguină determină infecții generalizate. Ele sunt precedate de trecerea masivă a bacteriilor dintr-un focar infecțios în sânge și semnifică incapacitatea mecanismelor de apărare a gazdei de a reacționa eficient față de agentul infecțios. Existența stabilă a unui număr mare de bacterii în sânge caracterizează *infecția septicemică*. Septicemia este consecința descărcării masive de bacterii dintr-un focar de infecție, vascularizat. Starea septicemică poate fi însoțită de toxemie, ca urmare a difuziei toxinelor din focar (abces, meningită).

Uneori, faza septicemică nu este precedată de multiplicarea agentului patogen la poarta de intrare. Agenții patogeni ai infecțiilor transmise de insectele hematofage (tifos exantematic, febra recurentă) sau prin mușcătură (leptospiroze) străbat mucoasele și trec direct în sânge.

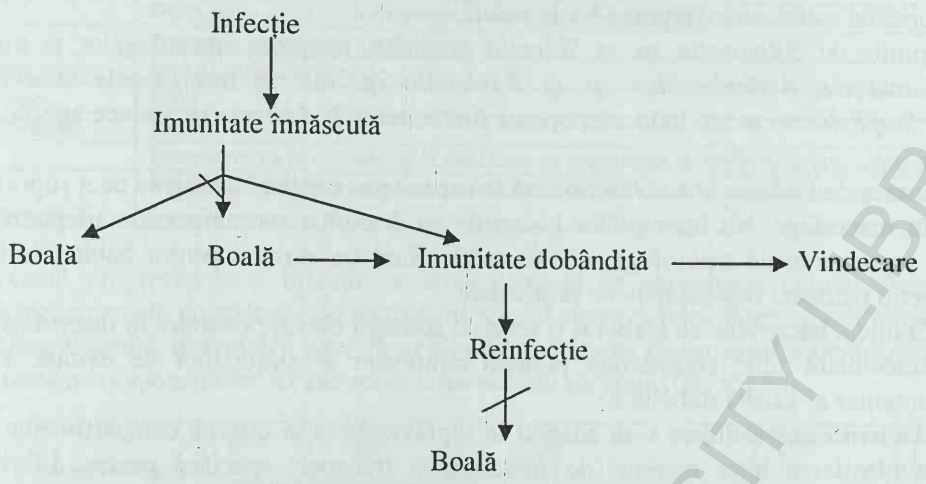
La pătrunderea unui agent infecțios, organismul gazdă mobilizează o serie de mecanisme de apărare înnăscute, care de cele mai multe ori reușesc să prevină multiplicarea și propagarea agentului infecțios, împiedicând astfel apariția bolii (tabelul 5). În unele situații, mecanismele de apărare înnăscute nu sunt suficiente pentru eliminarea agentului infecțios, iar atunci intră în acțiune mecanismele adaptative specifice față de agentul infecțios, mai eficiente, dar se activează după o perioadă de latență mai mare (tabelul 6).

Tabelul 5.

Mecanisme de apărare anti-infecțioasă la nivelul barierei cutaneo-mucoase.

Poarta de intrare	Mecanisme de apărare anti-infecțioasă
Țesut cutanat	Desicație pH acid Variațiile de temperatură Descuamarea celulelor epiteliale Microbiota rezidentă la acest nivel (competiție pentru siturile de aderență și colonizare) Foliculii piloși și glandele sebacee (conțin lizozim și lipide toxice cu efect microbicid) Țesutul limfoid subcutanat (SALT)
Mucoasă	Stratul de mucină reprezintă o barieră fizică, care captează bacteriile Stratul de mucus conține: lizozim, sIgA care previne atașarea bacteriilor la celulele mucoasei, lactoferină (prin legarea Fe previne multiplicarea bacteriilor; lactoperoxidază; cu efect microbicid (prin generarea radicalului superoxid). Descuamarea periodică a celulelor mucoasei îndepărtează bacteriile aderate la joncțiunile strânse și previne invazia printre celulele mucoasei Țesutul limfoid asociat submucoasei (MALT)
Mucoasa conjunctivală	Reflexul de clipire îndepărtează periodic microorganismele ajunse la acest nivel Secreția lacrimală (conține lizozim, sIgA, Lf)
Nazofaringe	Microbiota rezidentă Secreții (lizozim, sIgA, Lf, fagocite)
Tractul respirator superior	Mucus Mișcări ciliare
Plămân	Macrofage
Cavitate bucală	Descuamarea periodică Salivă (conține lizozim, sIgA, microbiota rezidentă, Lf)
Stomac	pH scăzut Enzime proteolitice
Intestin subțire	Descuamarea periodică Viteza mare a fluidului
Colon	Viteza scăzută a fluidului Descuamarea periodică Microbiota rezidentă abundentă.

Principala caracteristică a răspunsului adaptativ la o anumită infecție este instalarea memoriei imunitare.

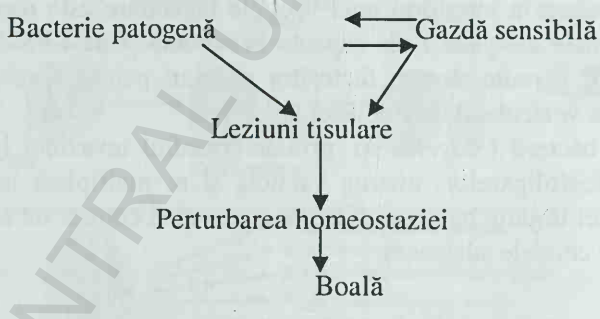


Tabelul 6..

Mecanisme de apărare anti-infecțioasă înnăscută și adaptativă.

Imunitate	*Înnăscută*	*Adaptivă*
Factori solubili	Lizozim, complement, CRP	Ac eficienți față de microorganisme extracelulare
Celule	NK, fagocite	Limfocite T /eficiente față de microoganisme intracelulare
Primoinfecție	+	+
Infecție secundară	+	+++
Memorie imunologică specifică	–	+

Interacțiunea gazdă-bacterie patogenă



Leziunile tisulare sunt rezultatul producerii toxinelor sau a unor răspunsuri exagerate din partea gazdei infectate (tabelul 7), mediate de interleukine pro-inflamatorii, activarea focarelor inflamatorii, inducerea sintezei autoanticorpilor care pot conduce la distrugerea țesuturilor (de exemplu, sechelele reumatismale după infecția cu *Streptococcus sp.*, spondilita anchilozantă după infecțiile cu *Klebsiella sp.*), activarea policlonală a limfocitelor T de către superantigenele bacteriene, cu efect mitogen asupra celulelor efectoare specifice ale răspunsului imun celular (enterotoxinele stafilococice, toxinele sindromului de șoc toxic, exotoxinele streptococice pirogenice, glicoproteinele de suprafață de la *Mycoplasma* sau glicoproteinele virale).

Tabelul 7.

Imunitate și imunopatologie post-infecțioasă

R.I. protector		Răspuns imun exagerat
Imunitate strict adaptativă: - alogenică - tranzitorie		Alergii Autoantigene (HLA)
Ac protectori: - neutralizanți; - opsonizanți (C, FcγR); - citotoxici		Ac facilitatori, autoanticorpi
R.I.:	- T_4 – TH_1 (macrofag)/TH_2 (Ac)	Reacții de hipersensibilitate
	- T_8 – citotoxic	Celule autoreactive
Citokine: IFNγ, TNFα, IL-2		TNFα, IL-1 → șoc septic mediat de LPS

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Infecțiile bacteriene pot modula apoptoza celulelor gazdei, inițiа inflamația sau evita mecanismele de apărare ale gazdei (de exemplu, *M. avium* și BCG blochează apoptoza celulelor gazdei, favorizând astfel supraviețuirea lor în celulă).

Tulpinile de *Salmonella sp.* și *Shigella sp.* induc apoptoza macrofagelor și inițiază astfel reacția inflamatorie; *Actinobacillus sp.* și *Bordetella sp.* distrug macrofagele și evită acțiunea fagocitelor; *Staphylococcus sp.* induce apoptoza limfocitelor T, *Listeria sp.* induce apoptoza celulelor dendritice.

Noțiunea de bacterie invazivă se referă la capacitatea celulei bacteriene de a supraviețui și/sau multiplica în macrofage. Nu întâmplător bacteriile au dezvoltat mecanisme de adaptare la modelul intracelular reprezentat de macrofage, aceste celule fiind un surogat pentru habitatele naturale ale anumitor agenți patogeni reprezentate de protozoare.

Celulele bacteriene au elaborat o serie de strategii de supraviețuire în macrofage, adaptarea la viața intracelulară fiind considerată punctul culminant al strategiilor de evitare a efectorilor sistemului imunitar al gazdei (tabelul 8).

Bacteriile intracelulare s-au adaptat la supraviețuirea în diferite compartimente ale celulei. Odată cu evidențierea unor markeri de maturare și transport specifici pentru diferite vezicule intracitoplasmatice, s-a dovedit că bacteriile intracelulare ocupă compartimente intracelulare foarte variate. Astfel *Shigella* sp., *Listeria* sp., *Rickettsia* sp. lizează membrana vacuolară și ajung în citoplasmă, un mediu bogat în nutrienți, *Coxiella sp.* poate supraviețui în mediul lizosomal, iar *Salmonella* sp., *Mycobacterium* sp., *Legionella* sp. inhibă fuziunea fagosomului cu lizosomul.

Pentru a pătrunde în celula gazdă *Salmonella sp.* și *EPEC sp.* induc influxul Ca^{2+}, în timp ce *Shigella sp.* utilizează proteinele Rho pentru a induce polimerizarea actinei. *Shigella* sp. și *Salmonella sp.* produc rearanjări tranzitorii ale filamentelor de actină, în timp ce *EPEC* induce formarea unei formațiuni de tip piedestal.

Supraviețuirea în interiorul unei vacuole fagocitare este mediată de enzime care degradează proteinele lizozomale ale gazdei, de capsula bacteriană și de LPS. *Salmonella sp.* supraviețuiește în mediu acid care îi permite sinteza factorilor necesari pentru persistență, în timp ce *Legionella* sp. previne acidifierea veziculei de endocitoză.

Anumite bacterii (*Shigella* sp. prin intermediul invazinei IpaB sau *Listeria* sp. cu ajutorul listeriolizinei și fosfolipazelor) distrug vacuola și se multiplică în citoplasmă. După liză, are loc condensarea actinei în jurul bacteriei și organizarea unei comete de actină care propulsează bacteria în citoplasmă și spre celulele adiacente.

Tabelul 8.

Mecanismele prin care diferiți agenți patogeni invadează celulele gazdei.

Specia bacteriană	Caracterul invaziv	Relația cu celulele gazdă	
Yersinia	Invazivă	β – integrine	Fagocitoză prin mecanism de fermoar, bazolaterală, activată de tirozinkinază
	Yad A	β – integrine	
	Ail	?	
L. monocytogenes	Internalină (IntA)	E-cadherină	Fagocitoză prin mecanismul de fermoar
Sh. flexneri	Ipa B-D	α5β – integrină	Văluri membranare, rearanjări majore ale citoscheletului
EPEC	Invazivă	Hp 90	Formarea piedestalurilor și aderență intimă, invazie slabă (dependentă de actină și microtubuli), acumularea citoscheletului sub bacterii mediată de tirozinkinază.

Majoritatea bacteriilor induc reorganizarea filamentelor de actină pentru a penetra în interiorul celulei eucariote, cu unele excepții (*Neisseria sp.*, *Campylobacter sp.* sau *Klebsiella sp.* nu se multiplică în interiorul celulei gazdă), care utilizează microtubulii.

Bacteriile intracelulare se diseminează prin disocierea joncțiunilor intercelulare, cu traversarea membranei bazale și deversarea în sânge sau limfă.

Un rol major în invazie îl au celulele M care posedă microvilozități la suprafața lor și care au o puternică activitate de endocitoză și conținut lizosomal redus, fiind capabile să internalizeze antigene particulate din lumenul intestinal ce nu sunt degradate și vor fi prezentate macrofagelor (de exemplu, antigenele de *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Yersinia* sp.) (tabelul 9).

Tabelul 9.

Interacțiunea unor agenți patogeni cu celulele M.

E.coli RDEC-1	Distrugerea microvililor/formarea piedestalurilor, nu are loc invazia
V. cholerae	Preluat în vacuole prin endocitoză
Campylobacter jejuni	Invazia activă în vacuole
Y. enterocolitica	Idem
Y. paratuberculosis	Idem
Sh. flexneri	Invazia activă în vacuole, apoi eliberarea în citoplasmă și răspândirea intercelulară
S. typhi *S. typhimurium*	Voaluri membranare, degenerarea microvililor, preluarea în vacuole, distrugerea celulelor M.

Succesul progresiei unei infecții invazive depinde de capacitatea celulei bacteriene de a interfera cu mecanismele de apărare ale gazdei, în scopul supraviețuirii interacțiunii inițiale cu prima linie de apărare a gazdei, dezvoltării unor strategii pentru evitarea mecanismelor de apărare ale gazdei, alterarea directă a componentelor RI sau modularea acestui răspuns (fig. 55, 56).

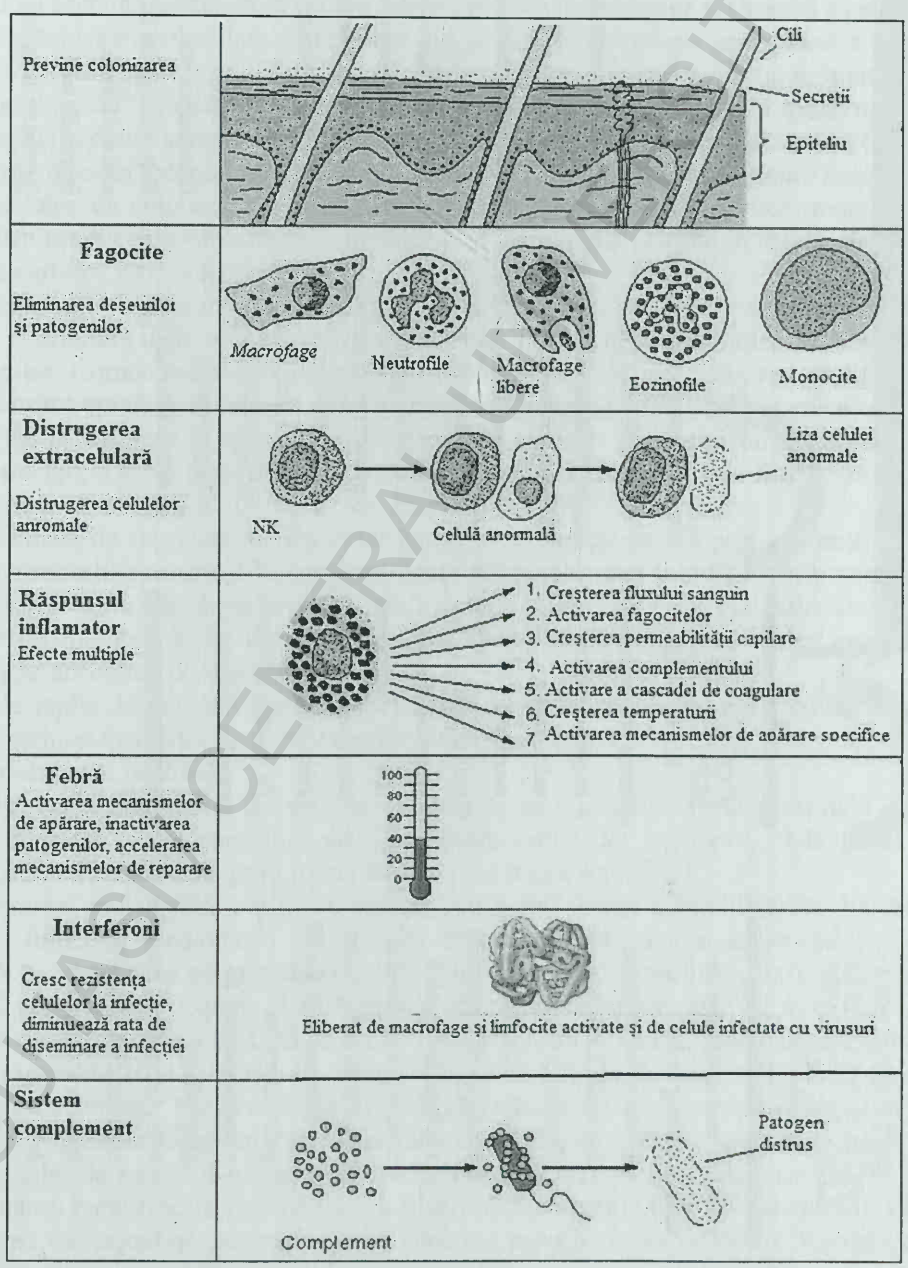


Fig. 55. Ilustrarea schematică a mecanismelor nespecifice de apărare anti-infecțioasă (după Roitt, 2004).

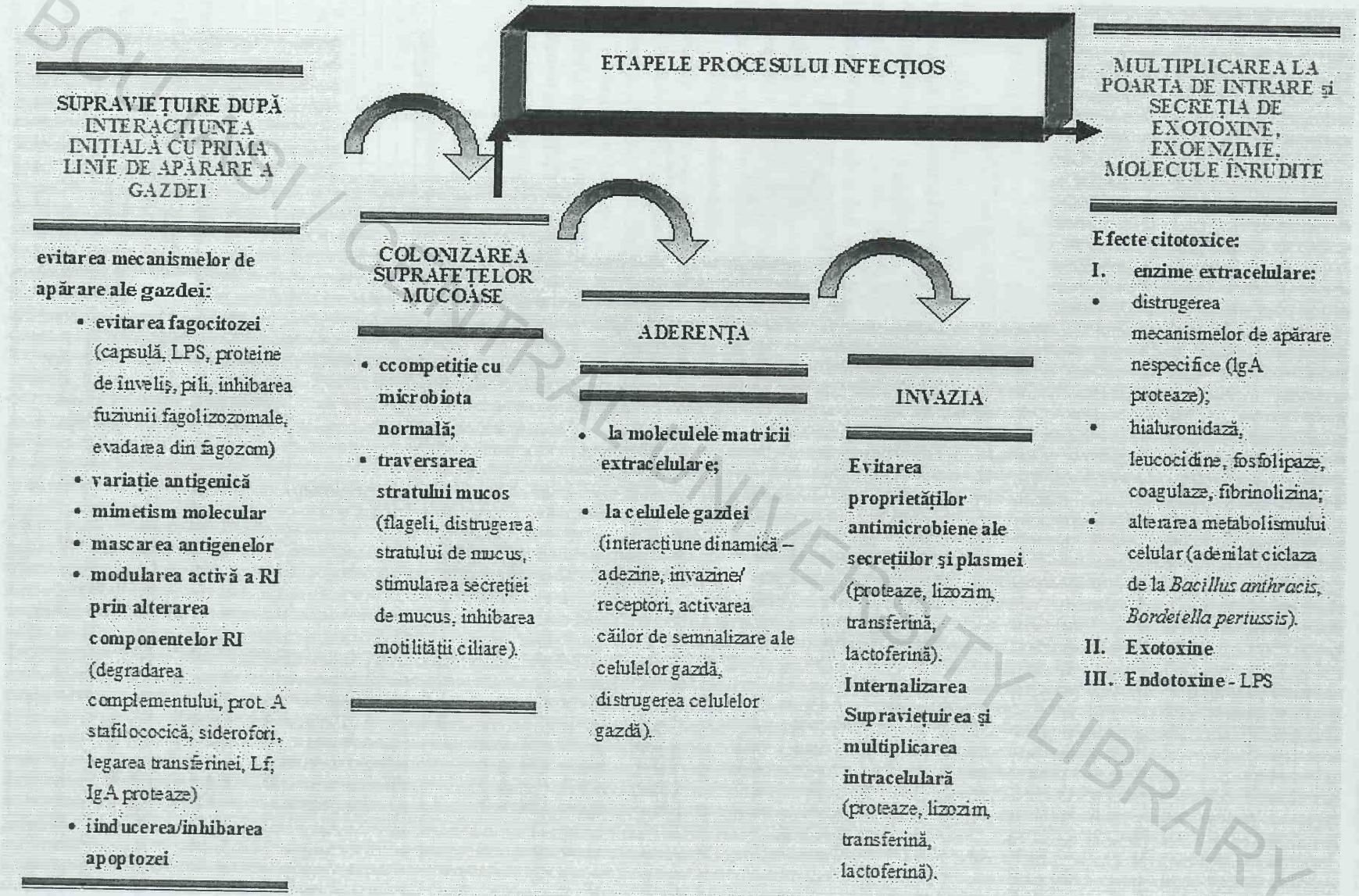


Fig. 56. Etapele procesului infecțios

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Interacțiunea celulelor bacteriene cu efectorii imunitari ai gazdei se realizează prin legarea celulelor bacteriene de proteinele matricii extracelulare şi mascarea antigenelor de suprafață bacteriană, evitarea fagocitozei, inhibarea RFC (prin intermediul capsulei, LPS), degradarea proteinelor complementului, strategii de preluare a Fe, variația antigenică a moleculelor de suprafață, legarea de regiunea Fc a moleculelor de Ig prin proteina A (*S. aureus*), legarea la heparină prin intermediul hemaglutininelor filamentoase FHA (*B. pertussis*).

Mecanisme prin care microorganismele evită apărarea gazdei

Infecțiozitatea microorganismelor patogene este dependentă de capacitatea lor de a coloniza țesuturile gazdei şi de a contracara mecanismele de apărare a gazdei. Capacitatea de variație rapidă a moleculelor de suprafață este o trăsătură evolutivă comună în tot spectrul patogenilor. Unele bacterii patogene au elaborat mecanisme ce permit *variația antigenică* rapidă şi eficientă a unor componente ale suprafeței, precum şi fenomenul *variației de fază*. Rata înaltă de mutație produce un număr mare de variante antigenice.

Cel mai comun mecanism prin care microorganismele patogene realizează evaziunea în raport cu efectorii sistemelor moleculare şi celulare ale gazdei este *variația antigenică* a componentelor suprafeței. Structurile suprafeței celulare sunt țintele majore ale răspunsului imun humoral. Termenul de "variație antigenică" sau "comutare fenotipică" se referă la capacitatea unei specii microbiene de a-şi modifica specificitatea antigenică a componentelor de suprafață. Aceeaşi structură (flageli, fimbrii, proteine ale membranei externe, polizaharidul capsular) se sintetizează în *variante biochimice diferite*, mărind capacitatea de colonizare a țesuturilor gazdei şi de evitare a factorilor imunitari. Informația genetică pentru producerea variantelor antigenice este disponibilă oricând în celulă, dar la un moment dat o singură variantă este exprimată.

Variația de fază semnifică posibilitatea comutării reversibile *on-off* a genelor, ceea ce înseamnă că o structură dată, este sau nu produsă. Pentru bacterii, rata variației de fază este de 1/100–1/1000/generație. Comutarea *on-off* în variația de fază semnifică pierderea sau câştigul reversibil al unei structuri de suprafață a celulei şi se datorează *plasticității fenotipice* a microorganismelor în general şi a celor patogene în special. Într-o populație clonală, după diviziune, majoritatea celulelor vor păstra caracterele fazei parentale, dar o minoritate vor comuta expresia fazei. Comutarea este un eveniment aleatoriu.

Moleculele de suprafață ale agenților patogeni se caracterizează prin secvențe de variabilitate accentuată a structurii primare. Ele sunt codificate de genele unei familii mari, prezente în variante multiple, ce formează o adevărată *serie polialelică*. Regiunile conservate ale moleculelor de suprafață sunt ancorate în membrană, iar secvențele expuse mediului extern şi sistemului imunitar al gazdei prezintă un grad accentuat de variație individuală.

Ratele înalte de mutabilitate ale genei (genelor) codificatoare par să producă un număr mare de forme antigenice distincte. Variabilitatea genetică este o modalitate de adaptare a organismelor la condițiile variabile ale mediului.

O altă sursă importantă de variație antigenică, ce poate fi o sursă potențială de evaziune a sistemului imunitar, este *modificarea post-traducere*. De exemplu, adăugarea grupărilor polizaharidice, modifică într-un grad foarte înalt antigenitatea suprafeței.

Generarea unui înveliş antigenic versatil, cu o rată înaltă a modificărilor biochimice, oferă organismului infecțios modalitatea de a evita efectul neutralizant al anticorpilor. De exemplu, patogeneza *N. gonorrhoeae* este condiționată de rolul esențial al fimbriilor pentru atașarea de celulele epiteliale. *N. gonorrhoeae* expune 3 antigene ale suprafeței celulare, care îşi modifică specificitatea antigenică cu o rată foarte înaltă: LPS prezintă 6-8 variante biochimice, proteinele membranei externe aparțin unui număr de 10–12 tipuri, iar variația antigenică a fimbriilor este nelimitată, specifică pentru fiecare tulpină bacteriană. Moleculele de fimbrilină evidențiază secvențe constante, semivariabile şi hipervariabile. Regiunile hipervariabile determină antigenitatea acestor structuri şi tropismul față de celulele epiteliale ale tractului urogenital uman. Numărul variantelor antigenice de *N. gonorrhoeae* este atât de mare, încât fiecare tulpină pare a fi distinctă antigenic de celelalte tulpini. Fiecare dintre cele 3 antigene de suprafață are mecanisme genetice proprii de variabilitate. Variația antigenică a gonococului permite evitarea răspunsului imun al gazdei.

N. meningitidis este capsulată şi numai fimbriile proemină dincolo de limitele stratului polizaharidic. De aceea, pierderea fimbriilor inhibă proprietatea de aderenţă la suprafaţa epiteliilor.

Polizaharidul capsular este *repelent* pentru fagocite, deoarece celulele fagocitare nu au receptori pentru polizaharidele capsulare. Uneori, acestea sunt asemănătoare oligozaharidelor din moleculele glicoproteice proprii organismului, ceea ce explică slaba lor imunogenitate. Tulpinile variante, necapsulate, sunt mai puţin virulente, dar au avantajul că nu sunt recunoscute de anticorpii specifici faţă de antigenele capsulare. Absenţa capsulei, la *H. influenzae*, conferă celulei o capacitate sporită de a se ataşa şi de a invada celulele epiteliale ale gazdei.

La *Str. pyogenes* s-au identificat peste 80 de serotipuri diferite, ce rezultă din mutaţiile punctiforme ale genei ce codifică *proteina M*, componentă a peretelui celular.

LPS protejează fizic celula bacteriană de acţiunea complementului şi a fagocitelor, constituind un strat protector, iar diversitatea glucidelor din polizaharidul terminal, conferă o variaţie antigenică extrem de largă. La. *S. typhimurium* s-au identificat peste 2500 de variante antigenice ale polizaharidului regiunii externe a LPS (antigenul O) şi ale flagelinei, cu tot atâtea specificităţi serologice. La *E. coli* sunt peste 150 de variante antigenice ale antigenului O şi peste 100 de variante ale antigenului K (capsular).

Tipul antigenic al bacteriilor poate fi marker al virulenţei, dată fiind natura clonală* a agenţilor patogeni. De exemplu, *V. cholerae* tip O1 şi antigenul O de tip 139 produc toxina holerică, dar foarte puţine dintre celelalte tipuri antigenice O au această proprietate.

* Populaţia de celule a unui agent patogen izolat dintr-un proces infecţios are natură clonală, toate celulele fiind descendente ale unui număr mic de celule identice din punct de vedere genetic.

Microorganismele care leagă acidul sialic* pe suprafaţa lor, îşi maschează situsurile antigenice critice şi evită sau inhibă efectorii imunităţii înnăscute. Avantajul selectiv al acidului sialic de suprafaţă, pentru supravieţuirea microorganismelor sau pentru persistenţă, este foarte mare.

* Denumirea de acid sialic vine de la cuvântul grec *sialon* = salivă, deoarece s-au descoperit în mucina glandelor salivare submaxilare. După unii autori, acizii sialici sunt nu numai cele mai interesante molecule ale lumii vii, dar şi cele mai importante. Acidul sialic (mai rar denumit acid neuraminic) desemnează o familie de peste 40 de cetoacizi naturali, cu 9 atomi de C. Sunt unici în lumea vie, deoarece sunt singurii derivaţi ai glucidelor cu 9 atomi de C, ce se găsesc la procariote.

Sinteza acidului sialic este limitată la metazoarele din grupul deuterostomienilor. Plantele, protostomienii (insecte, arahnide, crustacei, moluşte, cefalopode şi nematode) şi fungii nu au niveluri detectabile de acizi sialici, ceea ce sugerează că divergenţa căii evolutive a sintezei sale s-a făcut timpuriu în evoluţie.

Tapetarea suprafeţei celulare cu acid sialic este o modalitate eficientă de evitare a imunităţii înnăscute a gazdei. Microorganismele infecţioase utilizează mai multe strategii pentru acoperirea suprafeţei cu acid sialic:

- unele microorganisme sintetizează acidul sialic, care constituie o subunitate repetitivă a polizaharidului capsular la *E. coli* K_1 sau la *N. meningitidis*, care împiedică legarea de/şi invazia celulei gazdă, dar protejează bacteria de mecanismele imunităţii înnăscute. Sialil-transferaza implicată în sializarea lipooligozaridelor (LOS) este legată de membrană şi este expusă la suprafaţă, având acces la substratul sializat al gazdei. Sializarea LOS conferă meningococilor rezistenţă la mecanismele imunităţii înnăscute, cum ar fi fixarea C independentă de anticorpi;
- la unele tulpini de *N. gonorrhoeae* legarea acidului sialic la suprafaţă este catalizată de o sialil-transferază extracelulară;
- *T. cruzi, T. brucei, C. diphteriae* etc. utilizează o trans-sialidază a suprafeţei proprii: în mod obişnuit sialidaza transferă acidul sialic de la substratul sializat, la apă (hidroliză). Trans-sialidaza transferă acidul sialic la restul galactozil terminal sau la N-acetil-glucozamina unui receptor al suprafeţei parazitului (lactoza, respectiv lactozamina). Trans-sialidaza agentului patogen sializează nu numai moleculele endogene (proprii), dar şi moleculele celulei gazdă. Acceptorii endogeni ai acidului sialic sunt molecule asemănătoare mucinei, care după sializare protejează *Tripanosoma* din sânge de factorii protectori ai imunităţii înnăscute. Remodelarea prin sializare a glicoconjugatelor de

suprafață ale parazitului și ale celulelor gazdei este importantă pentru virulența sau pentru persistența paraziților transmiși de vectori;

- *H. influenzae* preia acidul sialic al gazdei prin transportori de mare afinitate (TRAP), îl activează și îl transferă la lipooligozaharid (LOS), moleculă asemănătoare cu LPS, dar căreia îi lipsește antigenul somatic O.

La spirocheta *Borrelia hermsii* (agentul febrei recurente, caracterizată prin crize febrile, separate de intervale asimptomatice), episoadele febrile semnifică apariția și multiplicarea unei noi variante antigenice. Antigenul variant este o *proteină* abundentă *a membranei externe* (VMP = variable major protein).

Mecanismul general al *microorganismelor eucariote* patogene pentru generarea variabilității componentelor de suprafață, este existența și *activarea succesivă a unui set de gene multiple care codifică sinteza aceleiași structuri chimice în variante chimice și antigenice distincte.* Genele sunt organizate în familii, care permit generarea unui repertoriu extins de variante antigenice.

Unul dintre cele mai studiate exemple de variație antigenică este al tripanosomelor africane care produc boala somnului. *T. brucei* (tripanosoma africană), agentul cauzator al bolii somnului, produce infecții persistente, cu valuri de parazitemie, datorită generării periodice a unor populații de celule ce diferă prin specificitatea antigenică a glicoproteinei majore a suprafeței (VSG). Succesiunea noilor variante antigenice este trăsătura biochimică determinantă a parazitului, iar ciclurile de parazitemie se succed, în absența tratamentului, până la sfârșitul letal al gazdei. În stadiile finale ale infecției, invazia și proliferarea în țesuturi și organe depășesc mijloacele de apărare ale gazdei.

Glicoproteina de virulență a suprafeței parazitului (VSG) este antigenul major, recunoscut de sistemul imunitar. Celulele individuale de *Tripanosoma* exprimă o singură variantă antigenică a VSG. În cursul infecției persistente, majoritatea celulelor parazitului sunt sensibile la acțiunea neutralizantă a anticorpilor, dar un număr mic de paraziți *comută la sinteza unei noi variante antigenice de VSG* și evită astfel acțiunea neutralizantă imediată a răspunsului imun mediat humoral, stimulat de populația parentală. Rata de variație antigenică este evaluată la $1/10^2$–10^7 celule. Celulele noii variante antigenice se multiplică și refac populația parazitului, mai bine adaptată pentru evaziunea efectorilor imunitari. Capacitatea de comutare periodică la noi variante antigenice ale VSG are ca rezultat epuizarea rezervelor de apărare, iar în final parazitul invadează țesuturile și sistemele de organe.

Celulele de *T. brucei* au capacitatea potențială de a expune în cursul unui proces infecțios peste 100 de variante antigenice ale VSG, codificate de un număr echivalent de gene, care formează o casetă genică și sunt transcrise coordonat, de la un număr limitat de promotori.

Glicoproteinele VSG sunt alcătuite din 400–500 aminoacizi și au o variație amplă a secvenței. Studiile de cristalografie cu raze X sugerează o uniformitate remarcabilă a conformației tridimensionale. Secvența primară a aminoacizilor este mai bine conservată la capătul carboxil, prin intermediul căruia molecula VSG se ancorează în membrana citoplasmatică a parazitului. VSG formează un monostrat compact pe suprafața parazitului, astfel încât numai o parte a moleculei este accesibilă legării anticorpilor. Învelișul glicoproteic pare a avea rolul de protecție a suprafeței parazitului de atacul sistemelor de apărare, inclusiv de atacul fagocitelor.

Infecția cu *P. falciparum* este persistentă, recurentă și se caracterizează printr-un tablou foarte variabil al manifestărilor clinice. Imunitatea specifică se dezvoltă lent și numai după infecții ample și repetate se consolidează un răspuns imun protector față de infecția severă, dar este o imunitate incompletă și incapabilă să sterilizeze organismul. În ariile geografice cu o rată înaltă de transmitere a parazitului, apar complicații severe, cu mortalitate crescută, la copiii sub 5 ani. Copiii care depășesc 5 ani au imunitate adecvată pentru a controla infecția. Starea de protecție persistă tot restul vieții, în condițiile inoculării continue a sporozoiților de la țânțarii infectați. Răspunsul imun față de antigenele parazitului este mediat de anticorpi (IgG), dar este condiționat de un set de citokine secretate de celule imunitare și neimunitare. Astfel s-ar explica faptul că la pacienții cu SIDA (care exacerbează dramatic evoluția tuberculozei sau infecțiile oportuniste), malaria nu are o evoluție mai severă, ceea se înseamnă că sinteza IgG este independentă de celulele T. Eritrocitele infectate sunt ingerate de macrofage, independent de IFN.

Severitatea diferită a infecției se datorează gradului diferit de virulență a agentului infecțios. Diversitatea antigenică a tulpinilor de *Plasmodium* este argumentată de miniepidemiile de malarie severă, care apar în zonele endemice. Generarea continuă a diferitelor populații variante antigenice de

paraziți, cu diferite specificități de aderență, este cauza infecțiilor persistente caracterizate prin unde de parazitemie și manifestări clinice specifice malariei. Severitatea miniepidemiilor este explicată prin variația proprietăților de *citoaderență* a eritrocitelor infectate, ca factor major al virulenței agentului malariei. Pe suprafața eritrocitelor infectate este expusă o diversitate de antigene ale parazitului, ceea ce favorizează aderența de diferite țesuturi. Astfel, eritrocitele infectate în stadiul matur al parazitului *P. falciparum*, prin antigenele membranare pe care le expun, pot fi reținute și sechestrate în alte țesuturi, în afara splinei: în creier, ficat. Aderența eritrocitelor infectate la țesutul cerebral, renal sau hepatic, este cauza formelor severe de malarie, cum ar fi *malaria cerebrală.*

Rata variației antigenelor expuse pe suprafața eritrocitelor este de circa 2% / generație, ceea ce duce într-un timp scurt la generarea unor populații foarte diverse de paraziți, atât în ceea ce privește antigenele de suprafață, cât și în capacitatea de a se lega de diferite molecule ale celulelor tisulare, inclusiv de endoteliul postcapilar și chiar de eritrocitele neinfectate.

În esență, modificarea proprietăților de antigenitate și citoaderență ale parazitului condiționează manifestările severe ale infecției malarice și favorizează persistența parazitului în competiție cu mecanismele de apărare ale gazdei și producerea infecțiilor repetate.

Un alt țesut care sechestrează eritrocitele infectate, este placenta. În perioada sarcinii, sensibilitatea la infecția cu malarie crește semnificativ, cu consecințe grave. Se crede că în țesutul placentei se găsește o mare densitate a receptorilor (condroitin-sulfatul A) prin intermediul cărora antigenele parazitului se fixează pe eritrocite.

Diversitatea fenotipică corespunzătoare variației antigenice este o strategie foarte eficientă pentru adaptarea la presiunea selectivă pe care o exercită efectorii răspunsului imun și la diversitatea de particularități structurale și funcționale ale țesuturilor gazdei. Mecanismele de variație sunt deosebit de importante pentru succesul diseminării unei infecții în populația gazdă.

Rolul citokinelor în procesul patologic infecțios

Citokinele sunt proteine sau glicoproteine, cu greutate moleculară mai mare de 5 kDa, ce pot fi secretate de orice celulă a organismului, cu posibila excepție a eritrocitelor, care se leagă și activează o varietate de celule. Citokinele sunt componente care participă la păstrarea homeostaziei mediului intern. Spre deosebire de hormoni, a căror acțiune se manifestă la distanță, citokinele acționează la nivel local.

Citokinele sunt implicate în toate etapele procesului patologic. Ele își produc efectele biologice numai după ce se leagă la receptorii specifici de mare afinitate de pe suprafața celulelor țintă, activează căile de semnalizare celulară și eventual comută un set particular de gene. Genele activate codifică sinteza unei varietăți de proteine: receptori de aderență intercelulară, proteaze, factorul de agregare plachetară, enzimele ce metabolizează lipidele, NO-sintaza și citokine, inclusiv citokina stimulatoare inițială. Efectele citokinelor sunt diverse: stimularea diviziunii și diferențierii celulei, inhibiția diviziunii sau apoptoza, stimularea chemokinezei (deplasarea orientată a celulei).

Afinitatea receptorilor de citokine pentru liganzii specifici este foarte înaltă (10^{-9} –10^{-15}). Majoritatea celulelor au un număr mic (sute sau câteva mii) de receptori. Activarea celulelor și producerea efectelor *in vivo* este indusă de un număr mic de molecule, care se fixează pe receptorii specifici.

Denumirea multor citokine reflectă activitatea biologică atribuită: TNF α (factorul de necroză tisulară) are efecte proinflamatorii, dar are o slabă activitate citotoxică (necrotică); TGF β (factorul de creștere al celulelor T) este un inhibitor al diviziunii celulelor epiteliale, astfel că denumirile citokinelor nu reflectă totdeauna efectele lor.

Citokinele proinflamatorii, IL-1, IL-6, TNF (cea mai puternică este IL-6) îndeplinesc următoarele funcții:

- stimulează ficatul să sintetizeze *proteinele de fază acută.* Proteinele de fază acută au rolul de opsonine și favorizează fagocitoza;
- induc sinteza *moleculelor de aderență intercelulară*: moleculele familiei selectinelor P și E, care leagă liganzii glucidici ai leucocitelor și determină încetinirea deplasării și fenomenul de rostogolire pe suprafața endoteliului, în focarul inflamator. Alți receptori endoteliali de aderență sunt moleculele de aderență intercelulară și vasculară ICAM/

VCAM (*intercellular cell adhesion molecules*)/(*vascular cell adhesion molecules*). Aceştia se leagă cu afinitate înaltă de contrareceptorii membranei leucocitului, denumiţi *β-integrine*, o familie de proteine heterodimerice (Henderson, 1996). Interacţiunea dintre integrine şi ICAM determină oprirea leucocitelor circulante şi trecerea în ţesutul conjunctiv (diapedeză). Leucocitele circulante exprimă constitutiv β2-integrine, dar într-o conformaţie nefuncţională. β2-integrinele pot fi activate sub acţiunea unor factori chimiotactici (IL-8). Se crede că bacteriile comensale induc sinteza unor citokine inhibitorii ale reacţiei inflamatorii.

Citokinele anti-inflamatorii inhibă procesul inflamator : IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, TGF ß.

Citokinele au o redundanţă enormă. Ele se activează în cascadă şi constituie o reţea complexă ce mediază interacţiunile dintre celule. Citokinele produse de o celulă induc sinteza în celulele sensibile a unui set de citokine, care include citokina de iniţiere.

5.2. Condiţiile de apariţie a procesului infecţios

Simpla prezenţă a unui microorganism patogen în mediul înconjurător nu este suficientă pentru a produce o infecţie la o gazdă sensibilă. Pentru iniţierea procesului infecţios sunt necesare următoarele condiţii obligatorii: existenţa unui *izvor de infecţie*, a unei *căi de eliminare* a agentului infecţios, a unei *căi de transmitere* şi a unei *porţi adecvate de intrare* în organismul sensibil. Domeniul specializat al patologiei infecţioase care studiază căile de eliminare, transmitere şi pătrundere a agenţilor patogeni în organism se numeşte *epidemiologie*.

a) *Izvorul de infecţie*

Necesitatea existenţei izvorului de infecţie derivă din faptul că mediul extern (sol, apă, aer) este nefavorabil creşterii şi multiplicării majorităţii agenţilor patogeni. Mediul extern asigură, cel mult, condiţii de supravieţuire temporară a microorganismelor şi de păstrare a infecţiozităţii virusurilor. Perpetuarea microorganismelor patogene în natură este condiţionată de existenţa unui izvor sau rezervor de infecţie, în care agentul patogen se multiplică. Aici se realizează procesul de acumulare naturală, de unde agentul patogen se diseminează şi contaminează alte organisme.

Izvorul de infecţie este diferit, în funcţie de agentul patogen şi de spectrul său de gazdă. Unele microorganisme şi virusuri infectează numai gazdele animale şi produc *zoonoze*, omul fiind infectat în situaţii accidentale. Alteori, agenţii patogeni produc boli infecţioase (transmisibile) strict caracteristice omului (denumite *antroponoze*) fără să infecteze organisme animale. În acest caz, omul reprezintă unicul izvor de infecţie în natură, cum este cazul unor viroze (variola, varicela, oreionul, poliomielita, guturaiul, gripa, hepatite) sau bacterioze (dizenteria bacteriană, febra tifoidă, febrele paratifoide, tusea convulsivă, sifilisul, gonoreea, lepra). În alte cazuri (febra tifoidă, scarlatina, difteria, poliomielita, holera), agentul infecţios este transmis atât de omul bolnav, cât şi de cel sănătos, *purtător* de agenţi patogeni. În unele cazuri, purtătorii sunt foştii bolnavi care s-au imunizat, nu mai prezintă simptome clinice, dar păstrează în organism agentul patogen, temporar sau pentru totdeauna, pe care îl elimină în mediu. Purtătorii sunt foarte importanţi pentru diseminarea agenţilor patogeni în mediul extern, deoarece fiind aparent sănătoşi sunt greu de depistat şi se deplasează liber în colectivităţi unde pot transmite infecţia la organismele receptive.

O altă categorie de boli infecţioase comune omului şi animalelor este reprezentată de *antropozoonoze*. Izvorul de infecţie este reprezentat de animale domestice sau sălbatice: câinele pentru rabie, febra butonoasă, leptospiroze; bovinele pentru salmoneloze, vaccină, bruceloză, tuberculoză, febra Q; şobolanul pentru salmoneloze, leptospiroze, febra muşcăturii de şobolan (febra *sodoku*), turbare, pestă (ciumă), tifos murin; păsările pentru encefalite virale, ornitoze, salmoneloze etc.

Controlul antropozoonozelor este foarte dificil pentru că în circuitul agentului patogen intră animalele salbatice. De exemplu, turbarea este răspândită la vulpe, veveriţă, liliac, de unde este transmisă la câine, iar de la câine la om. Chiar dacă incidenţa bolii scade după imunizarea câinilor prin vaccinare, virusul nu se poate elimina din populaţiile de animale sălbatice.

Unele microorganisme patogene se dezvoltă în primul rând în mediile naturale (apă, sol) şi numai accidental infectează gazdele: de exemplu, agenţii tetanosului şi ai gangrenei gazoase. Agenţii se multiplică în sol şi pentru a se menţine nu este necesară transmiterea la o gazdă. *Cl. botulinum*,

agentul botulismului, se dezvoltă numai în sol, de unde ajunge în conservele alimentare, se multiplică şi produce toxina, care după ingestie produce manifestări patologice.

b) *Calea de eliminare a agenţilor patogeni*

Agenţii patogeni care se multiplică în izvorul natural de infecţie sunt eliminaţi în mediu şi pot să infecteze gazde noi. Calea de eliminare este condiţionată de localizarea lor specifică în organism. Principalele căi de eliminare a agenţilor patogeni sunt cea intestinală şi cea respiratorie.

Calea *intestinală* este comună bacteriilor enterotrope, prin intermediul materiilor fecale, care pot conţine intermitent sau continuu, cantităţi mari de agenţi patogeni ai febrelor tifoide şi paratifoide, dizenteriei, holerei, ai toxiinfecţiilor alimentare, precum şi virusuri (virusul hepatitei A, virusul polio).

Calea respiratorie asigură răspândirea agenţilor patogeni ai maladiilor respiratorii (difteria, tusea convulsivă, rujeola, variola, varicela, oreionul, gripa, guturaiul), prin intermediul secreţiilor nazofaringiene şi bucale, proiectate în timpul tusei, strănutului, vorbirii. Pe această cale, omul bolnav sau infectat răspândeşte în jur o pulbere fină de aerosoli constituiţi din picături microscopice de secreţii încărcate cu agenţi patogeni. Într-un strănut se pot elimina între 10000–100000 celule bacteriene. Cele rezistente la uscăciune îşi păstrează viabilitatea pentru perioade lungi de timp, ataşate de particulele inerte.

Alte căi de eliminare a agenţilor patogeni sunt reprezentate de: răni şi supuraţii (în cazul infecţiilor produse de stafilococi, streptococi, bacilul piocianic, clostridiile gangrenei gazoase); calea urinară (pentru agenţii febrei tifoide, leptospirozei, febrei Q, tuberculozei renale); secreţia lactată (pentru agenţii brucelozei, tuberculozei, febrei Q).

Pentru agenţii patogeni care produc infecţii generalizate şi care nu au o cale naturală de eliminare din organism, ieşirea se realizează prin intermediul unui artropod hematofag care se hrăneşte cu sângele infectat (de exemplu, agenţii tifosului exantematic, ai pestei, ai encefalitelor virale, ai paludismului) sau ieşirea se face pe cale artificială, prin seringă sau instrumente chirurgicale infectate (agenţii hepatitelor virale B, C, D, ai sifilisului) (cale iatrogenă).

c) *Calea de transmitere a agenţilor infecţioşi*

După ce au fost eliminaţi din organismul bolnav sau purtător, agenţii patogeni trebuie să fie transmişi la o nouă gazdă receptivă. Transmiterea se realizează în mai multe modalităţi.

Transmiterea prin *contact direct* are loc în cazul în care, între organismul infectat şi cel receptor există o legătură directă şi se face prin *muşcătură* (agenţii turbării, ai febrei muşcăturii de şobolan), prin *supt* (la animale, agenţii febrei Q, tuberculozei, iar la om, *M. tuberculosis*, agenţii infecţiilor piogene), prin *sărut* (agenţii tuberculozei pulmonare, sifilisului, mononucleozei infecţioase), prin contact *cutanat* direct (agenţii dermatomicozelor, furunculozei), prin contact *sexual* (agenţii sifilisului, gonoreii, HIV). Când agentul cauzal este transmis prin căile genitale, infecţia se numeşte *venerică*.

De cele mai multe ori, transmiterea infecţiei este *indirectă*, prin interpunerea, mai mult sau mai puţin evidentă, a unui factor de mediu neanimat denumit *vehicul*, sau a unui organism denumit *vector*, între izvorul de infecţie şi organismul receptor:

- transmiterea prin intermediul produselor alimentare – carne, lapte, ouă, în cazul în care provin de la animale infectate sau sunt contaminate prin manipulare de către o persoană (bolnavă sau purtătoare) care elimină agenţi patogeni. Bacteriile patogene se multiplică de regulă în produsele alimentare. Astfel se transmit agenţii febrei tifoide, ai toxiinfecţiilor alimentare (cu *Staphylococcus* sp. şi *Salmonella* sp.), ai febrei Q, ai infecţiei cărbunoase, ai botulismului, ai tuberculozei;
- transmiterea prin intermediul obiectelor folosite de un bolnav (veselă, rufe, îmbrăcăminte, cărţi, jucării etc.) este posibilă un timp limitat după contaminarea acestora, proporţional cu rezistenţa agenţilor patogeni la condiţiile de mediu (agenţii tuberculozei, difteriei, scarlatinei, variolei);
- transmiterea prin vectori se realizează prin intermediul artropodelor, în special hematofage (insecte, capuşe), care preiau agenţii patogeni de la gazda infectată şi îi transmit la o nouă gazdă, fie prin înţepătură, fie depunându-i pe tegumentul intact sau lezat. Uneori, vectorul are numai *rol mecanic* pentru agentul patogen, pe care îl transportă în tubul digestiv sau pe suprafaţa corpului. Musca este vector mecanic pentru agentul patogen al febrei tifoide, al dizenteriei. Alteori, vectorul este el însuşi infectat şi realizează o *transmitere biologică*. În

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

acest caz, agentul patogen se multiplică masiv în corpul vectorului (de exemplu, *Ricketsia prowazeki*, agentul tifosului exantematic) sau străbate o fază a ciclului său vital (de exemplu, sporozoitul de *Plasmodium*, în corpul ţânţarului). Flavivirusurile (agenţii encefalitelor) se multiplică în organismul artropodelor vectoare, fără să producă leziuni tisulare;

- transmiterea prin intermediul aerului se face prin inhalarea picăturilor septice, răspândite de un bolnav sau de un purtător de agenţi patogeni. Cele mai eficiente sunt picăturile septice foarte mici (nuclei), care pot rămâne în suspensie în aer (ca aerosoli), mult timp după eliminarea lor din organism. Astfel se transmit agenţii gripei, guturaiului, rujeolei, rubeolei, varicelei, scarlatinei, tusei convulsive;
- transmiterea hidrică este proprie infecţiilor intestinale (agenţii febrelor tifoidă şi paratifoidă, holerei hepatitei A, enterovirozelor) şi leptospirozelor şi se produc prin contaminarea accidentală a unei surse de aprovizionare cu apă, cu agenţii patogeni proveniţi din dejecţii umane sau animale;
- transmiterea prin intermediul solului are loc în cazul unor plăgi, de regulă adânci, în care au fost antrenate granule de sol. Astfel se transmit infecţiile cu *B. anthracis*, cu *Cl. tetani*, agenţii gangrenei gazoase (*Welchia perfringens, Cl. oedematiens, Cl. histolyticum*).

d) *Poarta de intrare în organism*

Pentru ca agenţii patogeni să determine o boală infecţioasă este necesar ca ei să învingă barierele naturale protectoare ale gazdei. Poarta de intrare în organism corespunde, în general, căii prin care s-a facut eliminarea agentului patogen din organismul infectat.

De cele mai multe ori, poarta de intrare în organism este reprezentată de *calea respiratorie* (în infecţii ca oreionul, guturaiul, gripa, rujeola, variola, varicela, difteria, tusea convulsivă, scarlatina), *calea digestivă* (febra Q, hepatita virală A, poliomielita), *calea cutanată* (infecţia cărbunoasă, tularemia, febra Q, agenţii infecţioşi transmişi prin muşcătură, prin înţepătura vectorilor, prin rănire).

Unii agenţi patogeni pătrund în organismul receptiv pe mai multe căi, din care una este principală, dar determină aceleaşi manifestări indiferent de poarta de intrare. Alţi agenţi produc maladii cu caractere clinice diferite, în funcţie de poarta de intrare, ca *unic factor determinant* şi fără relaţie cu vreun caracter biologic particular al agentului patogen. De exemplu, *B. anthracis*, după pătrunderea pe cale tegumentară produce cărbunele cutanat, iar după ingestia alimentelor contaminate produce un proces patologic intestinal. Dacă infecţia se face pe cale respiratorie, rezultatul este infecţia pulmonară.

Infecţia reprezintă totalitatea proceselor biologice care se desfăşoară în organismul uman sau animal, ca urmare a pătrunderii şi multiplicării agenţilor patogeni.

Pentru iniţierea procesului infecţios, agentul patogen trebuie să pătrundă în organism pe o cale adecvată, iar organismul să fie receptiv (să permită multiplicarea agentului infecţios). În concepţia modernă, procesul infecţios trebuie interpretat ca rezultat al interacţiunii dinamice dintre micro- şi macroorganism. În concepţia ecologică, agentul infecţios este forţa motrice a procesului infecţios, iar reactivitatea imunitară a organismului condiţionează intensitatea, extinderea, gravitatea şi însăşi posibilitatea apariţiei procesului infecţios.

În raport cu momentul în care se face infecţia organismului uman şi animal se disting patru tipuri de infecţii.

a) Infecţia *germinală* se produce în cazurile în care ovulul sau spermatozoidul sunt purtătorii agentului infecţios, pe care-l transmit celulei-ou (pe verticală), odată cu caracterele ereditare. Acest mecanism de infecţie nu s-a demonstrat la om şi nici la animalele superioare. A fost descris la artropode (căpuşe din genul *Ornithodorus, Dermacentor, Rhipicephalus*), infectate astfel cu bacteria spiralată *Borrelia recurentis*, agentul patogen al febrei recurente de căpuşe. Ele devin astfel, rezervoare naturale de infecţie.

b) Infecţia *transplacentară* (intrauterină) este demonstrată şi la om. Uneori este condiţionată de producerea prealabilă a unor leziuni placentare sub acţiunea agentului patogen, ca de exemplu, *T. pallidum, Brucella* sp., *Coxiella burnetii* (agentul febrei Q). Alteori, infecţia are loc fără modificări placentare (infecţia variolică, rujeolică, hepatică etc.).

c) Infecţia *intrapartum* se produce în timp ce fătul traversează căile genitale (la expulzie), cu microorganisme patogene ale tractului genital matern (oftalmia şi conjunctivita gonococică a nou născuţilor).

d) Infecția *postpartum* se produce după naștere. În această categorie sunt cuprinse majoritatea infecțiilor omului și animalelor. Ele se manifestă în special după epuizarea imunității pasive, conferită de transferul anticorpilor materni prin placentă și colostru.

În raport cu originea microorganismelor care le produc, infecțiile sunt de două categorii:

- *exogene*, provocate de microorganisme care pătrund pe o cale adecvată;
- *endogene*, provocate de microorganisme autohtone (indigene), potențial patogene ale microbiotei normale, datorită scăderii rezistenței locale sau generale a gazdei, după iradiere, după tratamentul cu medicamente citotoxice, hormoni corticosteroizi, malnutriție, obstrucția căilor de excreție. Aceste infecții nu induc un răspuns imun detectabil și au tendința să revină ciclic sau să evolueze lent.

5.3. Modalități de evoluție a procesului infecțios

Infecția poate evolua în două modalități: *inaparent* sau *aparent*, ca boală infecțioasă.

Infecția *inaparentă* caracterizează acele situații în care procesul infecțios nu se exteriorizează prin simptomatologie clinică. De exemplu, infecția tuberculoasă inaparentă se detectează prin reacția de hipersensibilitate întârziată la tuberculină. Reacția este pozitivă la un procent mare de indivizi, dar maladia tuberculoasă clinică se manifestă la un procent mic din totalul persoanelor pozitive pentru testul tuberculinei. De cele mai multe ori, infecțiile inaparente se detectează prin reacții serologice *in vitro* sau prin reacții de hipersensibilitate *in vivo*. Uneori, infecția asimptomatică poate fi mortală. Explicația constă în paralizia mecanismelor de apărare a gazdei.

Infecția *aparentă* este cea care se manifestă printr-un ansamblu de semne clinice obiective și subiective, specifice și nespecifice, consecințe ale alterărilor produse de agentul infecțios și de produsele activității sale.

Maladia infecțioasă prezintă următoarele caracteristici; a) este produsă de microorganisme vii sau de toxine ale microorganismelor; b) poate realiza o imunitate specifică de durată variabilă; c) organismul bolnav poate deveni sursă de îmbolnăvire a indivizilor sănătoși; d) este specifică, în sensul că aceeași maladie este produsă întotdeauna de același agent cauzal, deși sub formă clinică se poate prezenta sub aspecte variate.

Etapele maladiei infecțioase

În evoluția sa, procesul infecțios aparent parcurge mai multe etape distincte, separate in timp.

Perioada de incubație sau perioada inițială este intervalul de timp scurs între momentul pătrunderii agentului patogen în organism și acela al debutului maladiei. Această perioadă este lipsită de simptome clinice evidente și are o durată variabilă (zile, săptămâni, luni sau este foarte scurtă), în funcție de natura agentului patogen, iar pentru același agent, în raport cu doza infectantă, cu virulența agentului patogen și cu reactivitatea imunitară a gazdei. Pentru infecțiile *exogene*, durata incubației se poate determina relativ precis, prin infecția experimentală a animalelor de laborator sau a voluntarilor. Pentru infecțiile *endogene*, perioada de incubație nu se poate determina. Din momentul contaminării este posibilă scurgerea unei perioade foarte lungi de timp până când microorganismul poate să inițieze un proces infecțios. În această perioadă, agentul patogen se multiplică, se localizează la nivelul situsului receptiv și eventual elaborează substanțe toxice.

Cel mai adesea, agenții infecțioși manifestă un organotropism evident, legat de faptul că, în general, fiecare specie își găsește condițiile optime de dezvoltare într-un anumit țesut. De exemplu, indiferent de calea de pătrundere, vibrionul holeric se localizează în intestinul subțire, bacilul dizenteric – în mucoasa intestinului gros, *Brucella* – în placenta bovinelor și ovinelor, datorită concentrației mari de eritrol (dar nu în placenta umană), *R. prowazeki* – în celulele epiteliale ale capilarelor SNC, *B. pertussis* – exclusiv în mucoasa bronșică.

B. anthracis se multiplică în orice țesut, chiar și în sânge.

Debutul bolii este marcat de momentul în care numărul de agenți infecțioși și cantitatea de toxine acumulate au atins un nivel critic. Debutul poate fi brusc sau lent și este caracterizat din punct de vedere clinic, prin instalarea (bruscă sau gradată) a semnelor bolii: febră, cefalee, frisoane, algii musculo-articulare. Debutul marchează începutul perioadei de invazie a agentului infecțios de la locul

multiplicării primare sau al eliberării unei cantități prag de toxină, spre noi zone sensibile, iar din punct de vedere cronologic şi clinic semnifică începutul *perioadei de stare*.

Perioada de stare este intervalul de timp în care maladiile infecto-contagioase îşi desfăşoară un tablou clinic cu simptome caracteristice, de amplitudine maximă, decisivă pentru evoluția ulterioară. În această perioadă poate surveni decesul.

La sfârşitul perioadei de stare, simptomele dispar brusc – *in crisis* (de exemplu, în pneumonia bacteriană), însoțită de sterilizarea bacteriologică sau lent – *in lysis* (în cazul febrei tifoide). Organismul se poate steriliza sau poate să rămână infectat pentru o perioadă nedefinită de timp.

În perioada de stare, organismul se imunizează abundent cu antigene ale agentului patogen şi se sintetizează anticorpi. Imunizarea are ca rezultat, de regulă, sterilizarea bacteriologică sau virologică a organismului. Uneori, organismul nu se sterilizează şi în focarele de infecție greu accesibile efectorilor răspunsului imun, agentul persistă, consecința fiind o *infecție cronică*.

Convalescența este perioada de timp în care organismul îşi reface potențialul de activitate, anterior îmbolnăvirii.

Infecția cronică corespunde unei stări de echilibru între agentul infecțios şi organismul gazdă, caracterizată prin faptul că vindecarea clinică (dispariția simptomelor) nu este însoțită de sterilizarea organismului. Focarele de infecție cronică au localizări greu accesibile factorilor de apărare ai organismului sau medicației: în SNC, în viscerele parechimatoase (ficat, rinichi, splină), în sinusurile osoase, în glandele bine încapsulate (prostata). Infecția cronică poate să persiste fără simptome clinice (sifilisul latent) sau poate evolua cu reacutizări intermitente la diferite perioade (bruceloza, tuberculoza, sifilis terțiar).

Starea de purtător este fie consecința unei infecții cronice, fie a persistenței pentru o perioadă de timp, a unui focar de infecție, în organismele clinic sănătoase. Uneori, foştii bolnavi tolerează la nivelul mucoaselor agentul patogen pe care îl elimină timp de câteva săptămâni (*Str. pyogenes, C. diphteriae, V. cholerae*). Alteori, bacteriile şi virusurile sunt eliminate pentru perioade îndelungate (de ordinul anilor): *S. typhimurium* rămâne localizată în vezica biliară, de unde se elimină intermitent, iar bolnavii de difterie pot rămâne purtatori ai bacilului *C. diphteriae*. Purtătorii creează probleme dificile din punct de vedere epidemiologic, deoarece reprezintă izvoare de infecție greu de depistat. Purtătorii sunt foarte periculoşi pentru sănătatea publică, mai ales dacă vin în contact cu alimentele, ca manipulatori sau preparatori ai acestora.

Tipuri de evoluție epidemiologică a infecției

Din punct de vedere epidemiologic, maladia infecțioasă poate evolua pe mai multe niveluri de extindere spațio-temporală şi incidentală:

- *evoluția sporadică* semnifică apariția cazurilor izolate de îmbolnăvire, atât în timp, cât şi în spațiu;
- *evoluția endemică* este definită prin apariția cazurilor relativ rare de infecție, care se mențin numeric constante într-o colectivitate şi apar cu relativă regularitate, de obicei sezonier, la intervale variabile de timp. Majoritatea indivizilor populației sunt imunizați şi deci indemni față de agentul infecțios;
- *evoluția epidemică*, caracterizează evoluția rapidă a unei infecții într-un interval scurt de timp, cu un număr mare de cazuri clinice într-o colectivitate (cămin, cazarmă, sat, regiune, țară). Se cunosc epidemiile de ciumă, gripă, rujeolă, scarlatină;
- *evoluția pandemică* este aceea în care maladia infecțioasă se extinde foarte rapid pe un teritoriu foarte larg (țări, continente), cu un număr foarte mare de cazuri clinice. Este caracteristică infecției gripale şi este favorizată de mijloacele de deplasare rapidă, la distanțe foarte mari.

Față de un agent patogen, absent în mod obişnuit dintr-un areal, populația poate fi foarte susceptibilă. La primul contact cu populația receptivă, agentul patogen declanşează o epidemie explozivă, dar odată cu instalarea stării de imunitate specifică, incidența maladiei scade.

Dacă agentul patogen îşi modifică specificitatea antigenică, epidemia evoluează şi într-o populație imunizată, deoarece, față de noile variante antigenice, populația nu posedă anticorpi specifici.

Epidemiile sunt condiționate de standardul de viață al comunității. Maladia tuberculoasă este o reflectare a acestei condiții, în timp ce bolile venerice sunt favorizate de promiscuitatea sexuală.

Bibliografie selectivă

1. Ahmed N., Dobrindt U., Hacker J., Hasnain S. E. 2008. Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. Nature Reviews Microbiology. 6:387–394
2. Balotescu M. C., Israil A. 2001. *Fenomenul de quorum-sensing bacterian.* Bact. Virusol. Parasitol. Epidemiol., 2001, 47: 5
3. Baron S. 2006. NCBI » Bookshelf » Medical Microbiology » Bacteriology » Bacterial Pathogenesis » Detection of Endotoxin in Medical Solutions
4. Barth H., Aktories K., Popoff M. R., Stiles B.G. 2004. Binary bacterial Toxins: Biochemistry, Biology and Applications of Common Clostridium and Bacillus Proteins – MMBR 68, 3, pp. 373–408.
5. Barton N. H., Bricks D. E. J., Eisen, J., Goldstein D. B, Patel N.H. Evolution. 2007–2009. Cold Spring Harbor Laboratory Press. All rights reserved.
6. Bhavsar A. P., Guttman J. A., Finlay B. B. 2007. Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens. Nature 449: 827–834
7. Bolstad A. J., Jensen H. B., Bakken V. 1996. Taxonomy, biology and periodontal aspects of Fusobacterium nucleatum – Clin. Microbiol. Rev. vol. 9, pp. 55–71.
8. Brooks G. F., Caroll K.C., Butel J. S., Morse S.A. 2007. Jawets, Melnick & Adelberg Medical Microbiology, 24th Ed.
9. Casadesus J., Low D.2006. Epigenetic Gene Regulation in the Bacterial World – MMBR. 70 (3): 830–856.
10. Coburn B., Sekirov I., Finlay B.B., 2007. Type III Secretion Systems and Disease – Clin. Micr. Reviews 20, 4, pp. 535–549.
11. Cornelis G. R. 2002. The Yersinia Ysc–Yop 'Type III' weaponry. Nature Reviews Molecular Cell Biology 3, 742–754
12. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 284(5418):1318–22.
13. De Kievit T. R., Iglewski B. H. 2000. Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. Infection and Immunity. 68 (9): 4839–4849
14. del Pozo J. L., Patel R. 2007. The Challenge of Treating Biofilm-associated Bacterial Infections. Clinical Pharmacology & Therapeutics. 82. 204–209
15. Donlan M. R., Costerton J. W. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clin. Microbiol. Rev. 15: 167–193.
16. Dune W. M. Jr. 2002. Bacterial Adhesion: Seen any Good Biofilms Lately? – Clin. Micr. Reviews, 15, 1, 155–166.
17. Geny B., Popoff R. M. 2006. Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells. Biology of the Cell 98: 667–678
18. Ghosh P. 2004. Process of Protein Transport by the Typ III Secretion System . MMBR. 68, 4: 771–795.
19. Hase C. C.,. Finkelstein R. A. 1993. Bacterial extracellular zinc-containing Metalloproteases. Micr. Rev. 57, 4: 823–837.
20. Hassa, P., Haenni S. S., Elser M., Hottiger M. O. 2006. Nuclear ADP-ribosylation Reactions in Mammals cells. MMBR, 70, 3: 789–829.
21. Henderson B., Poole S., Wilson M. 1996. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis – Microbiol. Rev. 60 (2):316–341.
22. Henderson I. R., Garcia F.N., Desvaux M., Fernandez R.C., Ala'Aldeen D. 2004. Type V Secretion Pathway: the Autotransporter Story. MMBR 68, 4, pp. 692–744.
23. http://d3jonline.tripod.com/10-Bacteria/Microbial_Virulence.htm
24. http://d3jonline.tripod.com/10-Bacteria/Microbial_Virulence.htm
25. http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/micro%20resources.htm
26. http://lib.bioinfo.pl/courses/view/312
27. http://lib.bioinfo.pl/courses/view/312
28. http://www.dartmouth.edu/~gotoole/swarm.html
29. Kaiser G. E. Doc Kaiser's Microbiology Home Page, Updated: Oct. 12, 2005
30. Kazmierczak M. J., Wiedmann M., Boor K.J. 2005. Alternative Sigma Factors and Their Roles in Bacterial Virulence. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 69, 4:527–543
31. Krueger K. M., Barbieri J. T. 1995. The family of bacterial ribosylating exotoxins – Clin. Microbiol. Rev. vol. 8, pp. 34–47.
32. Miethke M., Marabiel M. A. 2007. Siderophore – Based Iron Acquisition and Pathogen Control. MMBR. 71(3): 413–451.
33. Moran C. A. 2009. Nutritional approaches to controlling *Salmonella*. Pig Progress. Net. 25 (2)
34. Neilands J. B. 1995. Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. J.Biol. Chem. 270: 26723–26726.
35. Nizet V., Esko J. D. 2009. Bacterial and Viral Infections. Essentials of Glycobiology. CSH Press
36. Reid; C. W., Fulton; K. M., Twine S. M. 2010. Never Take Candy from a Stranger: The Role of the Bacterial Glycome in Host–Pathogen Interactions. Future Microbiology. 5(2):267–288.
37. Sears C. L.,. Kaper J. B. 1996. Enteric bacterial Toxins: Mechanisms of Action and linkage to Intestinal Secretion – Microbiol. Rev. 60(1): 250–265.
38. Vimr E. R., Kalivoda K. R., Deszo E. L., Steenbergen S. S., 2004. Diversity of Microbial Sialic Acid Metabolism – MMBR, 68, 1, pp. 132–153. 0
39. Wilson J . W., Schurr M. J., LeBlanc C. L., Ramamurthy R., Buchanan K. L., Nickerson C. A. 2002. Mechanisms of bacterial pathogenicity. Postgrad Med J. 78:216–224
40. www.chem.duke.edu/~alc/labgroup/research
41. http://diverge.hunter.cuny.edu/~weigang/Images/15-01_adherence_1.jpg
42. Caiazza N. C., Merritt J. H., Brothers K. M., O'Toole G. A. 2007. Inverse regulation of biofilm formation and swarming motility by Pseudomonas aeruginosa PA14. J Bacteriol.189(9):3603-12. Epub 2007 Mar 2.

6. COCI PIOGENI DE IMPORTANŢĂ MEDICALĂ

Cocii piogeni de importanţă medicală sunt implicaţi în etiologia unui spectru foarte larg de infecţii supurative şi non-supurative.

Cocii Gram pozitivi (*Staphylococcus aureus, Streptococcus pyogenes* şi *Str. pneumoniae*) (fig. 57) generează infecţii supurative şi produc circa 1/3 din totalul infecţiilor bacteriene umane (amigdalite, pneumonii, toxiinfecţii alimentare, infecţii cutanate, şocuri toxice severe).

Cocii Gram negativi piogeni sunt reprezentaţi de două dintre speciile genului *Neisseria*: *N. gonorrhoeae* şi *N. meningitidis* (fig. 57).

Fig. 57. De la stânga la dreapta: *S. aureus, Str. pyogenes, Str. pneumoniae, N. gonorrhoeae, N. meningitidis*, pe frotiuri colorate Gram din supuraţii cu coci piogeni (www.bact.wisc.edu/Bact303/pyogeniccocci.jpeg).

6.1. Coci Gram pozitivi, catalază-pozitivi, aerobi, de importanţă medicală

6.1.1. Genul *Staphylococcus* sp.

În manualul Bergey's, ediţia 1986, genul *Staphylococcus* este încadrat în familia *Micrococcaceae*, împreună cu genurile *Micrococcus*, *Planococcus* şi *Stomatococcus*.

Studiile la nivel molecular, bazate pe experimente de hibridizare şi stabilirea gradului de omologie a acizilor nucleici, la care s-a adăugat analiza altor proprietăţi (compoziţia chimică a peretelui celular) au demonstrat că genul *Micrococcus* este mai înrudit filogenetic cu actinomicetele, iar speciile aparţinând genului *Staphylococcus* sunt genetic mai asemănătoare cu lactococii, enterococii, lactobacilii, ca şi cu speciile genului *Bacillus*. Astfel, în ediţia 2004 a manualului Bergey, familia *Staphylococcaceae* este inclusă în Ordinul *Bacillales* (Buiuc şi Neguţ, 2008).

Aceste bacterii sunt larg răspândite în natură, fiind prezente în mediul acvatic, în sol şi în aer, dar şi în calitate de comensali pe tegument şi mucoase, la om şi animale.

Din familia *Micrococcaceae*, bacteriile cele mai implicate în patologia umană sunt stafilococii, care determină un număr mare de entităţi clinice: supuraţii, abcese, o varietate de infecţii piogene (foliculite, furuncule, endocardite, osteomielite etc.) şi septicemii fatale.

Speciile de stafilococi cel mai frecvent izolate în clinică sunt *S. aureus, S. epidermidis, S. haemolyticus, S. saprophyticus*. Stafilococii patogeni sunt adeseori hemolitici, coagulează plasma şi produc o diversitate de enzime extracelulare şi toxine. Forma cea mai comună de intoxicaţie alimentară este produsă de o enterotoxină termostabilă secretată de *S. aureus*.

Celulele sunt sferice, cu un diametru de 0,8–1 μm, imobile, nesporulate, aşezate în aglomerări asemănătoare ciorchinelui de strugure. În mediu lichid se găsesc sub forma cocilor izolaţi, a diplococilor, tetradelor sau a lanţurilor. Se colorează intens Gram pozitiv (fig. 58). Este de remarcat că speciile genului *Peptostreptococcus* (anaerob) se aseamănă ca morfologie şi mod de grupare cu stafilococii.

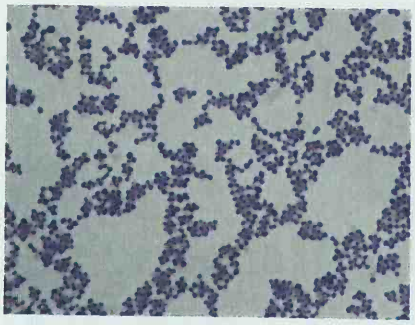


Fig. 58. Celule de *Staphylococcus* pe frotiul din cultură pură, colorat Gram (x 1500).

Celulele îmbătrânite tind să devină Gram negative. Stafilococii cresc pe majoritatea mediilor bacteriologice, în aerobioză şi microaerobioză, la 37°C şi fermentează glucidele. Cultura de *Staphylococcus* este o populaţie de celule heterogene ca dimensiuni, în ceea ce priveşte capacitatea de a sintetiza pigmenţi sau enzime, proprietăţile hemolitice, rezistenţa la medicamente şi virulenţa. Variabilitatea se datorează condiţiilor de mediu. La 25°C, majoritatea tulpinilor de stafilococ patogen sintetizează un pigment carotenoid galben-citrin (fig. 59). Acest pigment este produs de majoritatea tulpinilor de *S. aureus*, precum şi de *S. saprophyticus*. Stafilococii coagulazo-negativi formează pe mediu solid colonii albe, translucide (Howard and Kloos, 1987) (fig. 59).

S. aureus fermentează manitolul, în timp ce speciile de stafilococ coagulazo-negative (CNS) nu au această proprietate.

S. aureus subspecia *aureus* este agentul patogen major al infecţiilor dobândite în comunitate şi al celor nosocomiale. Denumirea speciei este dată de sinteza unui pigment auriu în condiţii favorabile de creştere. Multe colonii se pigmentează numai după o incubare prelungită. Pigmentul nu se sintetizează în bulion şi nici în anaerobioză. Unele tulpini de *S. aureus* nu produc pigment auriu, iar în condiţii nefavorabile de creştere, unele tulpini îşi pot pierde capacitatea de a produce hemolizina şi/sau coagulaza.

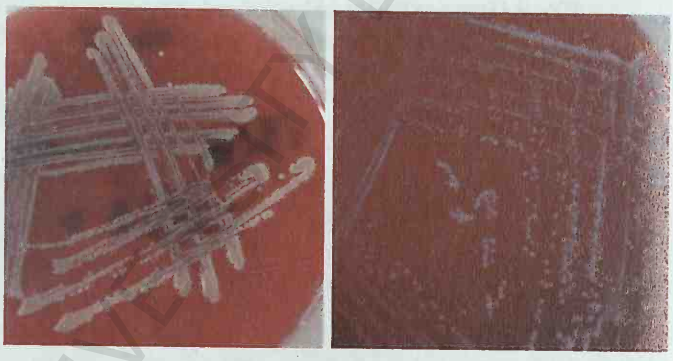


Fig. 59. Aspectul culturii de *S. aureus* producător de pigment auriu (stg.), şi al celei de *S. xylosus* (dr.) pe geloză sânge.

Stafilococii produc catalază (spre deosebire de streptococi), fermentează lent glucoza cu producere de acid, fără gaze. Speciile patogene secretă o mare diversitate de substanţe extracelulare.

Factori de virulenţă. Patogenitatea stafilococilor se datorează unui număr mare de factori de virulenţă (fig. 60), care conferă tulpinilor patogene proprietăţi noi fiziologice, metabolice şi de biosinteză: stafilococii au capacitatea de a se multiplica şi de a se disemina în ţesuturi; fac sinteza unui număr mare de tipuri de molecule toxice sau cu activitate enzimatică, codificate de gene plasmidiale sau cromosomale, conţin polizaharide şi proteine antigenice, stimulatoare ale sintezei anticorpilor opsonizanţi. Peptidoglicanul parietal este chemoatractant pentru PMN şi activează C.

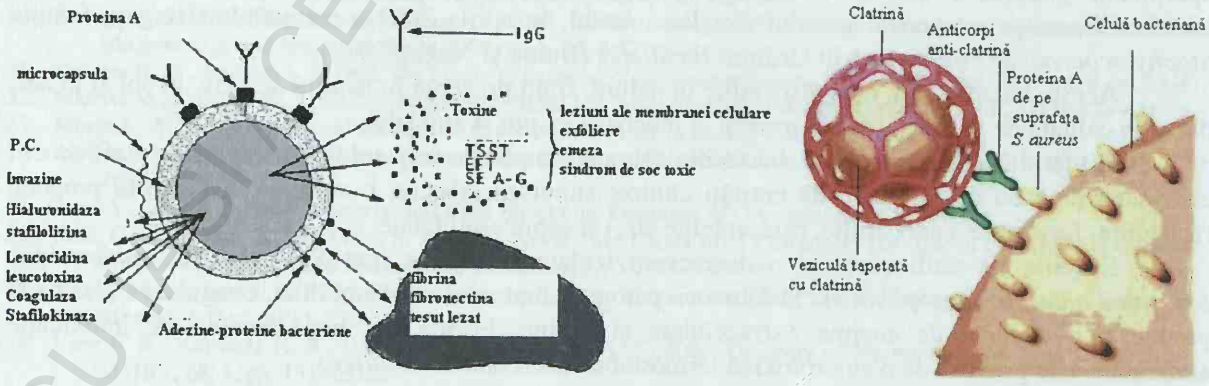


Fig. 60 a. Moleculele toxice şi enzimatice produse de *Staphylococcus* (după Todar, 2008). b. Utilizarea proteinei A de *S. aureus* în metodele de separare. O suspensie de vezicule membranare din mojaratul de ficat de şobolan se incubează în amestec cu Ac specifici anti-clatrină, proteina ce tapetează suprafaţa externă a unor vezicule citosolice. La amestec se adaugă o suspensie de celule de *S. aureus*, a cărei suprafaţă conţine proteina A, care leagă regiunea Fc a anticorpilor. Agregatele vezicule-bacterii se separă prin centrifugare la viteză mică (după Lodish, 5th Edition).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Factorii de virulență prezenți la Staphylococcus sp. sunt clasificați în mai multe categorii în funcție de: *particularitățile biochimice ce favorizează supraviețuirea în macrofage* (pigmentogeneza, producerea catalazei; fosfatază alcalină care determină scăderea pH în focarul de infecție); *mecanismele de evitare a răspunsului imun al gazdei* (proteina A; microcapsula, coagulazele libere și legate (*clumping factor*); *invazinele* (hialuronidaza este factor de invazie care acționează la începutul infecției, pentru că procesul inflamator inhibă acțiunea acestei enzime, stafilokinaza sau fibrinolizina, care acționează ca factor de difuzie, leucocidinele; proteazele; lipazele, ß-lactamazele); *exotoxinele* (α-toxina, β-toxina, leucocidina, toxinele exfoliative, toxina sindromului de șoc toxic, enterotoxine). Ingestia a 25 μgr de enterotoxină produce vomă și diaree.

Virulența este rezultatul unei combinații de factori extracelulari și toxici și a proprietăților invazive. Spectrul manifestărilor clinice este foarte diversificat: la un capăt al spectrului este *intoxicația alimentară* datorată ingestiei enterotoxinei preformate în alimentele contaminate; la cealaltă extremitate este *bacteriemia* stafilococică cu abcese diseminate în toate organele.

Tulpinile invazive produc coagulază, pigment și hemolizină. Cele neinvazive (*S. epidermidis*) nu produc coagulază și nici hemolizină, fiind implicate în producerea unor infecții asociate protezelor ortopedice, cardiovasculare sau la persoanele imunosupresate.

S. aureus cuprinde stafilococii coagulazo- pozitivi, patogeni pentru om și animale, de regulă hemolitici. Adeseori colonizează asimptomatic gazdele umane, cu statutul de comensal pe tegument și în cavitățile nazale. 20% dintre indivizii umani sunt colonizați persistent (pentru o perioadă lungă de timp), 60% sunt purtători intermitenți, iar 20% nu sunt colonizați. Purtătorii nazali de *S. aureus* joacă un rol cheie în dezvoltarea infecțiilor cu *S. aureus*. În primele două zile de viață, tegumentul nou-născuților este colonizat cu stafilococi (inclusiv *S. aureus*) de la persoanele de contact sau din mediu (Greenwood și colab., 1994). Vehicularea pe cale nazală la nou-născuți, cât și la persoanele mai în vârstă, este de obicei persistentă (timp de mai multe luni sau mai mulți ani). Alte situsuri de colonizare ale *S. aureus* pot fi: pliurile pielii, perineu, axile, vagin și tractul gastrointestinal. Deși este un membru frecvent al microbiotei normale, *S. aureus* este un patogen oportunist, ce produce un spectru larg de boli umane și animale. Factorii predispozanți pentru dezvoltarea acestor infecții sunt reprezentați de: (1) deficiențe de opsonizare (hipogamaglobulinemie), (2) leziuni ale pielii (arsuri, eczeme, incizii chirurgicale), (3) prezența de corpurilor străine (catetere intravenoase, dispozitive protetice), (4) infecții virale (gripa), (5) boli cronice (neoplazii, boli cardiace, SIDA, diabetul zaharat, alcoolism) și (6) injectarea intravenoasă a drogurilor.

S. aureus posedă cea mai largă varietate de mecanisme de virulență dintre toate microorganismele patogene pentru om și astfel reprezintă un model pentru studiul patogenezei bolilor infecțioase. Factorii de virulență (~ 70) sunt exprimați în mod coordonat în cursul diferitelor etape ale infecțiilor determinate (tabelele 8–9).

Tabelul 8.

Factorii de virulență și rolul lor în patogeneza infecțiilor cu *S. aureus* (adaptare după Peacock, 2002 și Archer, 1998).

Factori de virulență	Proprietăți	Rol în patogeneză
Adezine		
FnbpA și FnbpB	Ligand pentru fibronectină	
ClfA și ClfB	Ligand pentru fibrinogen	
Fib	Ligand pentru fibrinogen	
Proteina A	Ligand pentru domeniul Fc al IgG și vWF	Atașarea bacteriei la diferite componente ale celulelor eucariote și la membrana bazală a epiteliului
Bbp	Ligand pentru sialoproteina osului	
EbpS	Ligand pentru elastină	
Cna	Ligand pentru colagen	
Map/Eap	Proteină analoagă CMH clasa II	
Toxine		
TSST-1	Exotoxine cu activitate de superantigen	Manifestarea sindromului de șoc toxic;
SEA ... SEJ		Inducerea stării toxice specifice
Toxinele exfoliative ETA și ETB		Inducerea stării toxice specifice
Alfa-toxina	Toxină citolitică, formatoare de pori, lizează eritrocitele de iepure	
Beta-toxina	Sfingomielinaza – determină liza cald – rece a eritrocitelor de oaie	
Gamma-toxina	Leucocidină cu 2 componente	Inducerea stării toxice specifice
Delta-toxina	Toxină citolitică, sinergia lizei dintre tulpina producătoare de beta-toxină și izolatul de testat pe geloză-sânge de oaie 3%	
PVL	Leucocidină cu 2 componente	
Coagulaza	Leagă protrombina, activează conversia fibrinogenului la fibrină	

Exoenzime Proteaze Nucleaze Lipaze Hialuronat-liaza Stafilokinaza Colagenaza	Invazine care degradează componente structurale specifice din ţesuturile gazdei	Invazia ţesuturilor
Capsula/microcapsula Proteina A Coagulaza Enzime ce metabolizează acizii graşi Leucocidina şi/sau gamma-toxina		Evitarea mecanismelor de apărare ale organismului gazdă infectat

Cu excepţia sindroamelor toxemice, care sunt datorate producerii de superantigene (fig. 60a), patogeneza *S. aureus* este rezultatul acţiunii combinate a diferiţilor factori de virulenţă asociaţi celulei bacteriene şi extracelulari. Proteinele extracelulare aparţin unuia dintre următoarele tipuri: *receptine, toxine* şi *enzime.*

Principalele etape ale patogenezei infecţiilor cu *S. aureus* sunt: (1) colonizarea, (2) internalizarea, (3) invazia şi diseminarea sistemică şi (4) toxigeneza.

Colonizarea

Aderenţa *S. aureus* la celulele eucariote şi la dispozitivele medicale implantate reprezintă o etapă importantă în iniţierea infecţiei stafilococice. Adezinele mediază colonizarea şi condiţionează persistenţa *S. aureus* in diferite situsuri ale organismului uman. Capacitatea *S. aureus* de a adera la proteinele plasmatice şi la proteinele matricei extracelulare depozitate pe biomateriale este un factor important în patogeneza infecţiilor asociate cu dispozitivele medicale (L.G. Harris, 2002). Aderenţa este mediată de două tipuri de adezine, numite şi receptine (Kronwall & Johnsson, 1999). Din primul grup fac parte moleculele MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*), cunoscute şi sub denumirea de *receptine asociate suprafeţei celulare.* Adezinele MSCRAMMs sunt ataşate covalent la peptidoglicanul peretelui celular, iar liganzii pot fi reprezentaţi de molecule de elastină, colagen, laminină, fibrinogen, fibronectină. Din familia de adezine MSCRAMMs fac parte*: (1) proteina A, (2) proteinele de legare a fibronectinei (FnBPs: FnbpA şi FnbpB), (3) factorii clumping ClfA şi ClfB, (4) proteina de legare a colagenului şi (5) proteina de legare a sialoproteinei osului (Bpb)*

Adezinele din cel de-al doilea grup sunt cunoscute sub denumirea de *receptine secretate* sau *molecule de aderenţă secretate* (*Secretable Expanded Repertoire Adhesive Molecules* - SERAMs), şi sunt ancorate necovalent la suprafaţa celulei gazdă. Din această familie fac parte: *proteina extracelulară de legare a fibrinogenului* (*extracellular fibrinogen binding protein, Efb*), *Eap* (*extracellular adherence protein*), *Emp* (*extracellular matrix binding protein*) şi *coagulaza.*

Proteina A (Spa) este o proteină majoră a suprafeţei celulare, fiind prezentă la majoritatea tulpinilor de *S. aureus*. Manifestă o specificitate crescută de legare la domeniul Fc al IgG (subclasele 1, 2, 4, adică 95% din IgG total), cu rol în evitarea fagocitozei. De asemenea, proteina A leagă factorul von Willebrand (vWF), precum şi proteina gC_1qR, prezentă pe suprafaţa trombocitelor aderate, cu rol în patogeneza bolilor endovasculare stafilococice.

Reactivitatea extractului celular de S. aureus cu toate serurile umane s-a atribuit iniţial imunităţii specifice înnăscute antistafilococ. Ulterior s-a evidenţiat că proteina A se leagă nespecific cu fragmentul Fc al IgG umană. Proteina A nativă este un polipeptid cu 5 domenii, fiecare cu circa 60 de aminoacizi. Forma solubilă a proteinei A, eliberată prin digestia peptidoglicanului cu lizostafin (o endopeptidază stafilococică) se leagă cu regiunea Fc a IgG prin oricare dintre cele 5 domenii.

In vitro, proteina A are proprietăţi mitogene faţă de celulele T şi este super-Ag pentru limfocitele B.

Proteina A este un reactiv important în studiile imunologice. Imobilizată de sepharoză sau de alte suporturi, proteina A este un ligand de afinitate pentru IgG. Toate speciile de mamifere au IgG cu afinitate pentru proteina A.

Proteina A este un imunosorbent. Pentru prepararea imunosorbentului, celulele de S. aureus ce exprimă proteina A se fixează cu formol şi se omoară prin tratament termic. Proteina A rămâne legată de peretele celular şi funcţională pentru legarea Fc. Celulele astfel tratate şi adăugate la o soluţie de Ac, adsorb rapid Ac şi CI. Legarea este suficient de stabilă şi rezistă spălărilor repetate şi

centrifugării. Astfel, celulele de S. aureus fixate cu formol sunt ideale pentru captarea Ac şi a complexelor Ag-Ac. Deoarece proteina A este un reactiv eficient de legare pentru majoritatea anticorpilor IgG, orice alt complex preformat care conţine IgG va determina aglutinarea reactivului de Staphylococcus.

Selectivitatea înaltă a proteinei A pentru regiunea Fc a anticorpilor din complexele imune, a condus la folosirea proteinei A în locul anticorpilor secundari în multe tehnici imunologice. Proteina A este foarte utilă în metodele de testare a supernatantelor de hibridoma pentru prezenţa AMC.

Stafilococul tapetat cu anticorpi devine reactiv indicator pentru a detecta prezenţa Ag corespunzătoare specificităţii Ac cuplaţi.

Tehnica de coaglutinare s-a folosit pentru a detecta prezenţa Ag bacteriene în LCR sau în urină. Este utilă pentru identificarea imunologică a bacteriilor din cultură, cu reactivi comerciali, pentru gruparea streptococilor etc.

Proteinele de legare a fibronectinei – FnBPs (fibronectin binding proteins), sunt localizate la suprafaţa celulei bacteriene, fiind exprimate numai în faza exponenţială foarte timpurie de creştere. Toate tulpinile de *S. aureus* izolate din clinică posedă cel puţin una din cele două FnBPs (FnbpA, FnbpB). FnbpA mediază aderenţa la valvele lezate ale inimii şi promovează internalizarea *S. aureus* în celulele epiteliale.

Factorii clumping (ClfA şi B) sunt *receptine asociate suprafeţei celulei bacteriene* cu rol de adezine principale, care mediază legarea *S. aureus* la fibrinogen, tapetează rapid suprafeţele biomaterialelor implantate şi astfel contribuie la ataşarea *S. aureus* la aceste implanturi.

Proteina de legare a colagenului este importantă în patogeneza infecţiilor musculoscheletale (artrită septică, osteomielită). Strategiile terapeutice care au ca scop inhibiţia legării colagenului ar putea fi utile în prevenirea şi tratamentul infecţiilor musculoscheletale.

Proteina de legare a sialoproteinei osoase (Bpb) este implicată în patogeneza infecţiilor osoase (osteomielită) şi articulare (artrită septică).

Proteina de legare a elastinei (EbpS) facilitează colonizarea de către *S. aureus* a ţesuturilor lezate bogate în elastină (plămâni, piele).

Receptine secretate. Proteina extracelulară de legare a fibrinogenului (Efb) (anterior denumită Fib) este produsă în mod constitutiv de tulpinile de *S. aureus* în cursul fazei postexponenţiale de creştere, fiind secretată în mediu. Inhibă specific agregarea plachetară şi leagă fragmentul C3b, inhibând astfel activarea căilor clasice şi alternative ale complementului.

Coagulaza este secretată de către majoritatea tulpinilor patogene de *S. aureus*, fiind o receptină bifuncţională: leagă fibrinogenul şi coagulează plasma, cu formarea cheagului de fibrină. Coagulaza nu este o enzimă, ci o proteină extracelulară (forma liberă), ce se leagă la protrombina gazdei pentru a forma complexul reactiv echimolar stafilotrombina. Activitatea proteazică caracteristică trombinei este activată în acest complex şi are ca rezultat conversia fibrinogenului la fibrină, ceea ce duce la formarea cheagului de fibrină, produsul final al coagulării. O mică proporţie a coagulazei se găseşte sub formă legată pe suprafaţa celulelor bacteriene (factorul *clumping*) unde poate reacţiona cu protrombina. Coagulaza produce coagularea plasmei recoltată cu oxalat sau citrat, prin legarea de protrombină. Sinteza coagulazei este un factor de virulenţă şi conferă potenţial invaziv. Factorul de aderenţă (*clumping factor*) este diferit de coagulază şi determină depunerea fibrinei pe suprafaţa stafilococului, modificând rata ingestiei de către fagocite. Coagulaza liberă are rol în blocarea accesului factorilor bactericizi din plasma extravazată şi a leucocitelor la locul agresiunii stafilococice în exudatul inflamator.

S. aureus posedă o receptină secretată multifuncţională cunoscută sub mai multe denumiri: *proteina extracelulară de aderenţă (Eap)* sau *molecula analogă cu CMH clasa II (Map),* sau *p70.* Adezina Eap are capacitatea de se lega la o varietate de proteine ale matricei extracelulare, precum şi la proteinele plasmatice: fibronectina, fibrinogenul şi protrombina. De asemenea, Eap poate forma oligomeri şi ulterior se poate lega la câteva structuri de pe suprafaţa *S. aureus,* mediind astfel, atât aderenţa *S. aureus* la dispozitivele protetice tapetate cu proteine gazdă, cât şi agregarea intercelulară a *S. aureus*. Această adezină are câteva roluri importante în patogeneza infecţiilor cu *S. aureus*: (1) are rol în internalizarea *S. aureus* în celule epiteliale şi fibroblaste; (2) modulează răspunsul imun prin inhibiţia recrutării neutrofilelor şi a răspunsului de hipersensibilitate întârziată; (3) interferă cu funcţia

celulelor T, conducând la boli cronice ca artrita sau osteomielita. O funcție nouă, recent descrisă pentru această adezină este cea de potențial inhibitor al angiogenezei.

Polizaharide extracelulare

Celulele prezintă *fimbrii* și o *microcapsulă* ce poate fi evidențiată la celulele din culturi de patru ore în bulion nutritiv, prin tehnica colorației negative cu tuș de India. Microorganismele implicate în infecții invazive, produc de regulă polizaharide capsulare extracelulare, cunoscute sub denumirea de *capsulă, slime* sau *glicocalix*. Termenul *slime* este de obicei utilizat pentru a desemna exopolizaharidele strâns asociate celulei bacteriene, care măresc vâscozitatea mediului de cultură lichid însămînțat cu tulpina care posedă acest factor de virulență. Producerea *slime* este implicată în aderență și în colonizarea dispozitivelor medicale.

Capsula este un factor major al virulenței bacteriene, cu rol antifagocitar. Majoritatea tulpinilor de *S. aureus* izolate din clinică (peste 90%) prezintă la exteriorul peretelui celular o capsulă polizaharidică. Tulpinile cu capsulă propriu-zisă produc *colonii mucoide* (tulpini M) și sunt rezistente la fagocitoză. Majoritatea izolatelor produc colonii nemucoide pe mediul agarizat și au microcapsulă (O'Riordan și colab., 2004). Capsula sau microcapsula conțin acid hexozaminuronic și împiedică interacția anticorpilor antiparietali cu receptorii suprafeței fagocitelor. În infecțiile experimentale pe șoarece, tulpinile mucoide injectate intra-abdominal nu sunt fagocitate, se multiplică, produc toxina α și moartea survine în 24-48 de ore.

Polizaharidele capsulei, în stare purificată, sunt slab imunogene pentru om și animale dar au proprietăți imunomodulatoare. Ele sunt antigene T-independente, dar după cuplarea cu o proteină *carrier* devin imunogene și antigene T-dependente. Conjugatele polizaharide-proteine induc sinteza anticorpilor anti-polizaharidici la titru înalt, iar rapelurile cresc titrul acestor anticorpi.

Internalizarea

Capacitatea *S. aureus* de a evita mecanismele imunității umorale ale gazdei prin internalizare și supraviețuire intracelulară reprezintă a doua etapă a infecției, ce conduce la persistența bacteriei pe termen lung. Infecțiile cu *S. aureus* reapar în pofida tratamentului corespunzător cu antibiotice. O asemenea persistență rămâne frecvent neexplicată. O posibilă cauză poate fi capacitatea *S. aureus* de a supraviețui în interiorul celulelor gazdă.

S. aureus este cunoscut în principal ca un patogen extracelular, dar s-a observat că, *in vitro,* poate invada o varietate de fagocite neprofesioniste: celule epiteliale, fibroblaste, osteoblaste și celule endoteliale. Astfel, *S. aureus* este internalizat, invadează fagocitele neprofesioniste printr-un mecanism ce necesită interacția specifică între anumite adezine (FnBPs, Eap) și celulele gazdă, ulterior are loc procesul de transducție a semnalului în celulele gazdă prin proteina tirozin-kinază, au loc rearanjamente ale citoscheletului și preluarea bacteriei în endosom. *S. aureus* are capacitatea de a scăpa din endosom, de a se multiplica și supraviețui în citoplasma celulei gazdă. Totuși, nu se cunoaște mecanismul prin care membrana endosomului este lezată. *S. aureus* internalizat în linii de celule epiteliale pulmonare are capacitatea de a se multiplica; această caracteristică având un rol important în frecvența și persistența infecțiilor invazive. *S. aureus* internalizat poate persista, scăpând mecanismelor de apărare a gazdei, sau se multiplică și ulterior se disemineză.

Procesul internalizării este urmat de modificări profunde în metabolismul celulelor endoteliale, incluzând sinteza IL-1, IL-6 și IL-8 și a moleculelor de aderență celulară – ICAM-1 și VCAM-1.

Invazia și diseminarea sistemică

În primele ore după infecție, stafilococii sunt îndepărtați din circulația sangvină, în parte datorită fagocitozei, dar și prin aderarea bacteriilor la țesuturile gazdei. Stafilococii care scapă procesului de fagocitoză se multiplică în țesuturile infectate și generează răspunsuri proinflamatorii mediate de citokinele și chemokinele eliberate de către macrofage, neutrofile și alte celule imunitare. Migrarea masivă a leucocitelor la situsul infecției este însoțită de necroză și de formarea unui strat de fibrină la periferia leziunii pentru a preveni diseminarea microbiană și a permite îndepărtarea resturilor de țesut necrotic. Activarea timpurie a răspunsului imun înnăscut limitează extinderea focarelor de infecție și scade severitatea infecțiilor stafilococice. Stafilococii ajunși în circulație pot adera prin mecanisme mediate de MSCRAMMs, la celulele endoteliului. După endocitarea de către celulele endoteliale, bacteriile elaborează enzime proteolitice care facilitează răspândirea către țesuturile

adiacente. Factorul tisular este exprimat de către celulele endoteliale, facilitând depozitarea fibrinei şi formarea de vegetaţii. După endocitarea stafilococilor, celulele endoteliale activate exprimă receptori Fc şi molecule de aderenţă VCAM şi ICAM şi eliberează IL-1, IL-6 şi IL-8, cu efect chimiotactic pozitiv pentru leucocite care migrează prin diapedeză la nivelul leziunii endoteliale. Atât macrofagele tisulare, cât şi monocitele circulante eliberează IL-1, IL-6, IL-8 şi TNF-α după expunerea la stafilococi. Citokinele eliberate în circulaţie de către monocite sau macrofage, precum şi de către celulele endoteliale, contribuie la instalarea sindromului septic şi a vasculitei asociate cu boala stafilococică sistemică.

Invazinele

S. aureus secretă o serie de proteine extracelulare, denumite invazine (proteaze, lipaze, nucleaze, colagenaze, coagulază, stafilokinază, hialuronidază) cu rol în degradarea componentelor tisulare şi în invazie (fig. 61). Coagulaza şi stafilokinaza sunt două receptine secretate, care frecvent sunt considerate exoenzime, dar nu sunt enzime adevărate, ci receptine, deoarece se leagă şi activează enzimele gazdă prin formarea de complexe cu acestea.

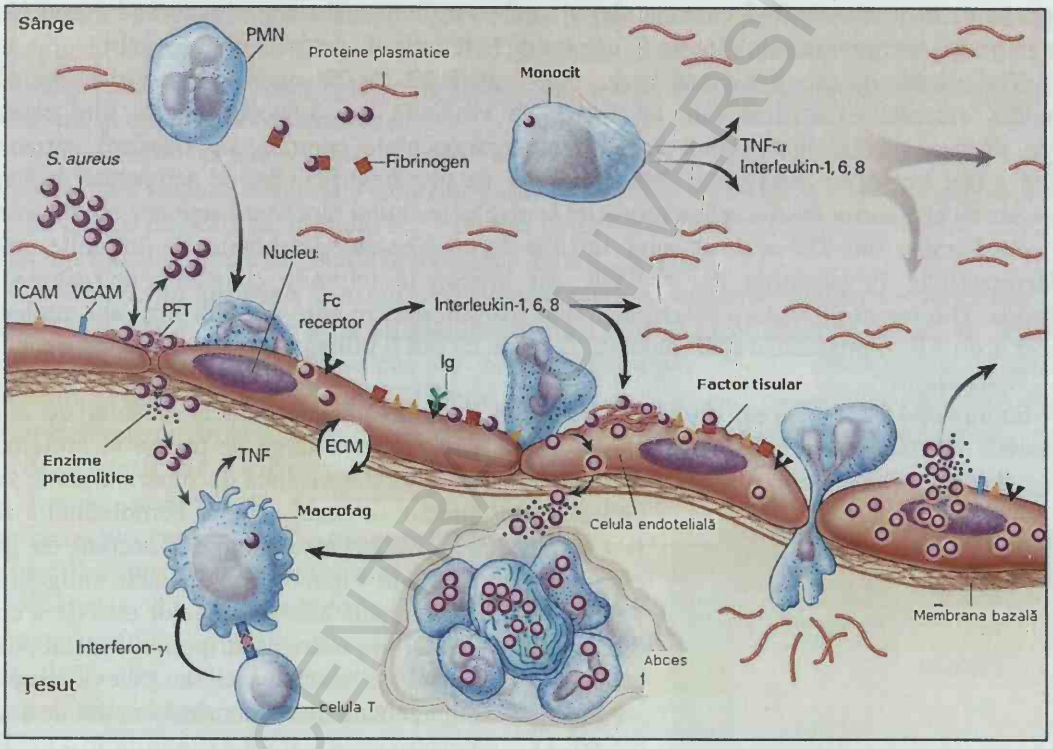


Fig. 61. Patogeneza invaziei tisulare a stafilococilor. Secvenţa evenimentelor progresează din partea stângă către cea dreaptă (după Lowy, 1997).

Stafilokinaza (Sak) facilitează legarea *S. aureus* la plasminogenul gazdă prin receptorii de pe suprafaţa celulei bacteriene şi astfel promovează invazia ţesuturilor gazdă. Asemănător coagulazei, stafilokinaza formează un complex echimolar cu plasminogenul. În acest complex, plasminogenul este activat cu formarea plasminei. Plasmina activată este o serin-protează cu spectru larg care degradează cheagurile de fibrină şi proteinele complexului matricei extracelulare (ECM), cu excepţia colagenului. Plasmina poate activa procolagenazele latente şi alte enzime proteolitice, care împreună cu plasmina determină degradarea colagenului şi a proteinelor ECM. În cursul infecţiei, Sak determină eliberarea stafilococilor prinşi în cheagurile de fibrină, fiind un factor de difuzie ce favorizează diseminarea bacteriilor în organismul gazdei. De asemenea, Sak formează un complex cu α-defensinele şi induce eliberarea de către polimorfonucleare a α-defensinelor. Producerea stafilokinazei conduce la neutralizarea α-defensinelor gazdei. α-defensinele sunt peptide bactericide ce furnizează protecţie faţă de infecţiile bacteriene prin distrugerea integrităţii pereţilor bacterieni.

Exoenzime/Exoproteine/proteine extracelulare sunt factori de virulență secundari, a căror funcție principală este de a converti țesuturile gazdă locale în nutrienți necesari pentru creşterea stafilococilor. Exoenzimele sunt prezente atât la *S. aureus*, cât şi la stafilolococii coagulazo-negativi: *S. epidermidis* şi *S. lugdunensis*. Deşi unele toxine (hemolizinele) sunt în mod evident enzime, acestea nu sunt grupate împreună cu exoenzimele stafilococice (lipaze, lecitinaze proteaze, nucleaze, hialuronidaza şi colagenaza).

Lipazele şi *lecitinazele* sunt enzime implicate în patogeneza tulpinilor de *S. aureus* prin capacitatea lor de a induce formarea porilor în membrana celulelor eucariote, prin alterarea conținutului lipidic al acestora. Astfel, aceste enzime acționează asupra lipidelor plasmatice şi tegumentare, ceea ce explică tropismul şi colonizarea de către stafilococi a tegumentelor în zonele cu glande sebacee. De asemenea, lipazele au capacitatea de a inactiva lipidele bactericide.

Proteazele sunt enzime extracelulare cu specificitate scăzută, care hidrolizează proteinele la peptide şi aminoacizi, fiind implicate în distrugerea țesuturilor gazdei. *S. aureus* produce patru proteaze extracelulare majore: serin-proteaza stafilococică (proteaza V8 sau SspA), o metaloprotează denumită aureolizină (Aur), două cistein-proteaze: staphopaina (Scp) şi proteaza SspB. Serin-proteaza V8 degradează toate clasele de Ig umane, dar şi unele adezine stafilococice, sugerând faptul că aceste enzime participă la tranziția celulelor de *S. aureus* de la fenotipul adeziv la unul invaziv.

Hialuronidaza, sau hialuronat-liaza, este sintetizată de *S. aureus*, dar nu şi de către *S. epidermidis*. Această exoenzimă este un factor de virulență mai important decât alte exoenzime, deoarece distruge acidul hialuronic, unul dintre componentele centrale ale matricei extracelulare, facilitând astfel invadarea țesuturilor. Este un factor de invazie/difuziune, ce acționează la începutul infecției pentru că ulterior reacția inflamatorie de la nivelul țesutului blochează acțiunea acestei enzime.

Nucleazele sau *DN-azele* – sunt enzime termorezistente elaborate de tulpinile patogene coagulazo-pozitive în proporție de 90-95%, dar lipsesc la tulpinile coagulazo-negative şi la *S. epidermidis*. Din punct de vedere biochimic, sunt fosfodiesteraze care pot hidroliza atât molecula de ADN, cât şi de ARN, producând fosfomononucleotide, ce pot fi utilizate în sintezele bacteriene.

Toxigeneza

Supraviețuirea *S. aureus* în cursul infecției depinde de capacitatea acestuia de a depăşi mecanismele de apărare ale gazdei. *S. aureus* produce o varietate largă de toxine şi proteine, care inactivează celulele sistemului imunitar prin eliberarea de citokine mediată de superantigene, sau prin citotoxicitate directă, în cazul acțiunii hemolizinelor (Bhatia şi Zahoor, 2007). Majoritatea tulpinilor secretă un grup de citotoxine care include 4 hemolizine distincte antigenic (α, ß, γ şi δ). Funcția principală a hemolizinelor este de a converti componentele tisulare în nutrienți disponibili metabolismului bacterian. Unele tulpini produc una sau câteva exoproteine suplimentare, reprezentate de toxina sindromului de şoc toxic (TSST-1), enterotoxinele stafilococice (SEA...SEE şi SEG...SEQ), toxinele exfoliative (ETA, ETB) şi leucocidina Panton-Valentine. Funcția principală a toxinelor este de a inhiba răspunsul imun al gazdei față de *S. aureus*, dar fiecare toxină exercită şi funcții biologice specifice, responsabile de manifestări clinice particulare.

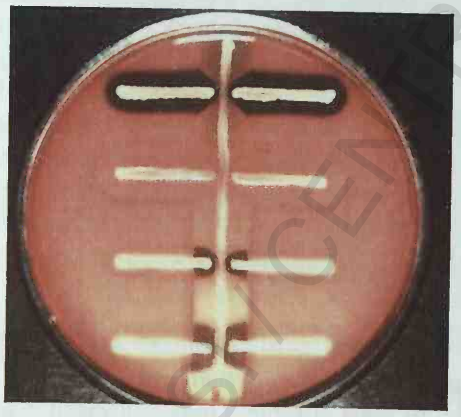


Fig. 62. Aspectul hemolizei sinergice produse de diferite tulpini de *S. aureus*. Vertical: *S. aureus* producător de β-hemolizină; orizontal: *S.aureus* producător de α-hemolizină; *S.aureus* producător de β-hemolizină; *S.aureus* producător de δ-hemolizină; *S. haemolyticus* producător de δ- hemolizină http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=16.

Hemolizine

Hemolizinele sunt citotoxine cu efect citopatic şi citolitic pentru o diversitate de celule: eritrocite, leucocite, macrofage, hepatocite, limfocite, limfoblaste, fibroblaste, neutrofile şi plachete (fig. 62). Tulpinile de stafilococi patogene pentru om prezintă cel mai frecvent asociația de α şi δ hemolizine (82%).

α-hemolizina (α – toxina) are acțiune litică asupra eritrocitelor de berbec şi de iepure, foarte slabă asupra hematiilor umane, dar este foarte agresivă față de toate

țesuturile, inclusiv față de macrofage și trombocite. Monocitele sunt rezistente la acțiunea α-hemolizinei. Efectele se datorează, în mare parte, formării porilor cu diametrul de 1–2 nm, ce conduc la alterarea balanței ionice a celulei. Efectul final asupra gazdei este edemul pulmonar sau sindromul de detresă respiratorie. Un alt mecanism prin care α-toxina poate conduce la edem este contracția celulelor endoteliale determinată de pierderea ATP, împreună cu influxul de calciu. În final, fluxul de calciu activează nucleazele celulare, conducând la moartea apoptotică a celulelor. Are acțiune citotoxică selectivă asupra celulelor musculare netede din pereții vaselor de sânge conducând la vasoconstricție și ulterior la ischemie și necroză tisulară. În plus, α-toxina își exercită efectul asupra plachetelor sangvine putând conduce la eliberarea factorilor procoagulării prin influxul ionilor de calciu. α-toxina este dermonecrotică și neurotoxică, determinând distrugerea tecii de mielină. Un alt efect al α-toxinei este acela de a promova aderența neutrofilelor la celulele endoteliale în reacția inflamatorie timpurie. Toxinele formatoare de pori (alfa și gamma-hemolizina) determină eliberarea de mediatori inflamatori, cum ar fi fosfolipaza A2, prostaglandina I2, factorul de activare a plachetelor, leucotriena B4 și oxidul nitric. Toți acești mediatori pot contribui la debutul final al artritei septice.

β-hemolizina (β-toxina) este hemolitică pentru eritrocitele de berbec, dar nu și pentru cele de iepure și umane. Este o sfingomielinază C, a cărei activitate este intensificată prin incubarea la + 4°C, după tratamentul timp de 18–20 ore la 37°C, de unde rezultă denumirea de hemoliză cald-rece. Sensibilitatea diferită a eritrocitelor la β-hemolizină poate fi explicată prin conținutul diferit în sfingomielină al eritrocitelor mamaliene.

γ-hemolizina și *leucocidina Panton-Valentine (PVL)* aparțin familiei de toxine sinergohimenotropice, care lezează membrana celulelor gazdă prin acțiunea sinergică a două tipuri de proteine.

PVL este prezentă la tulpinile de *S. aureus* comunitare, fiind asociată cu leziuni necrotice ale pielii sau mucoaselor și cu pneumonia hemoragică severă necrotică.

δ-hemolizina (δ-toxina, δ-lizina) determină lezarea membranei celulare a eritrocitelor umane, de berbec, de iepure, precum și a diferitelor structuri subcelulare: organite legate de membrană, sferoplaști, protoplaști. De asemenea are acțiune citolitică asupra neutrofilelor, limfocitelor, trombocitelor și macrofagelor. Circa 97% dintre tulpinile de *S. aureus* produc această toxină citolitică, a cărei sinteză este controlată de sistemul de *quorum sensing*. Are activitate dermonecrotică.

Superantigene – toxine pirogenice

Toxina sindromului de șoc toxic (TSST-1) și *enterotoxinele stafilococice (SEs)* sunt superantigene pirogenice – PTSAgs (*pyrogenic toxin superantigens*) înrudite structural, cu proprietăți toxice specifice, pirogene, superantigenice și sensibilitate la șocul endotoxic.

Calitatea de superantigen a toxinelor constă în capacitatea de a stimula nespecific proliferarea limfocitelor T prin legarea la o regiune specifică variabilă a lanțului β a (receptorului T celular) RCT (fig. 63). Consecutiv legării are loc eliberarea masivă a citokinelor proinflamatorii, caracteristice pentru un răspuns de tip Th1: TNF-α, IL-6 și IFN-γ, mediatoare ale patofiziologiei sindromului de șoc toxic stafilococic (STSS).

TSST-1 este un superantigen produs de anumite tulpini de *S. aureus*, precum și de anumite tulpini de *Str. pyogenes*. Toxina activează un număr mare de limfocite Th, se leagă direct de moleculele CMH II, fără a mai necesita internalizarea și prelucrarea, determinând activarea limfocitelor și eliberarea consecutivă a unor cantități mari de IL-2 și de IL-1 din macrofage.

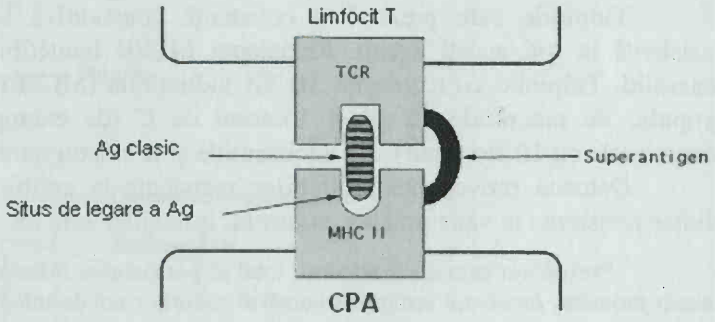


Fig. 63. Ilustrarea schematică a mecanismului molecular al acțiunii superantigenelor. Superantigenul stimulează nespecific un număr mare de clone de celule T, deoarece leagă încrucișat receptorul celulei T (RCT) și molecula CMH II a celulei care prezintă antigenul. Legarea superantigenului cu RCT și cu molecula CMH este nespecifică, în afara situsului de recunoaștere a antigenelor obișnuite. Celulele T activate eliberează citokine ce mediază starea de șoc și leziunile tisulare.

țesuturile. Creşterea frecvenței septicemiilor cu bacterii Gram pozitive se datorează capacității sale de a coloniza cateterele intravasculare şi materialele implantate chirurgical, precum şi rezistenței la meticilină. Antigenele inductoare ale inflamației sunt acizii lipoteichoici (ALT), peptidoglicanul parietal, toxinele secretate inductoare ale şocului septic, peptidele formil-metionil şi ADN bacterian. ADN bacterian are proprietăți proinflamatorii şi inițiază artrita. Inflamația este stimulată de citokinele secretate de monocite/macrofage: TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-8. IL-8 este atractant puternic pentru neutrofile, iar MCP-1 (proteina-1 chemoatractantă macrofag/monocit) şi MIP-1 (proteina-1 inflamatorie a macrofagelor) sunt atractante pentru monocite la situsul inflamației.

Concentrația serică maximă a citokinelor induse de bacteriile Gram pozitive se realizează la 50–75 de ore, iar pentru cele Gram negative, la 1–5 ore de la infecție. TNF-α are rol determinant pentru evoluția procesului inflamator indus de bacteriile Gram negative, iar pentru bacteriile Gram pozitive, efectele TNF-α se produc în cooperare cu celelalte citokine proinflamatorii.

Fagocitele profesioniste (neutrofilele şi macrofagele) leagă antigenele de *S. aureus* (LTA) prin intermediul receptorului membranar TLR-2 (*Toll-like receptor*-2) (Fournier şi Philpott, 2005). Primul receptor al familiei Toll a fost identificat la *Drosophila melanogaster*, foarte rezistentă la infecțiile microbiene, deoarece sintetizează peptide antimicrobiene. Sinteza peptidelor este reglată de un receptor Toll, iar mutantele Toll⁻ sunt sensibile la infecțiile fungice şi bacteriene. De aceea, Toll este un receptor esențial pentru recunoaşterea imună înnăscută la *D. melanogaster*.

Rezistența la antibiotice a tulpinilor de S. aureus

Rezistența la penicilinele stabile la penicilinaze a fost denumită în trecut rezistența la meticilină. În prezent se foloseşte termenul MRSA (*methicillin resistant Staphylococcus aureus*) sau *S. aureus* rezistent la oxacilină. Stafilococii sensibili la penicilină sunt sensibili şi la alte peniciline, precum şi la cefalosporine, cefemi şi carbapenemi. Tulpinile rezistente la penicilină, dar sensibile la cefoxitin sunt rezistente la penicilinele sensibile la penicilinaze şi sensibile la penicilinele stabile la penicilinaze (oxacilină, meticilină, dicloxacilină, nafcilin), la cefeme şi carbapenemi, precum şi la combinațiile dintre un β-lactam şi un inhibitor al β-lactamazei. Circa 90% dintre tulpinile de *S. aureus* produc β-lactamază şi sunt rezistente la penicilină. Tulpinile rezistente la cefoxitin manifestă rezistență la toți β-lactamii. Astfel, sensibilitatea/rezistența unei tulpini de *S. aureus* la β-lactami poate fi dedusă prin testarea numai la cefoxitin şi penicilină.

Tulpinile MRSA prezintă o frecvență crescută în spitale şi în unitățile de îngrijire pe termen lung. Pot determina infecții grave, iar opțiunile de tratament sunt limitate.

Rezistența *S. aureus* la macrolide poate fi datorată efluxului activ (codificat de gena *msrA*), care conferă rezistență numai la macrolide şi la steptograminele de tip B, sau modificării țintei ribosomale când apare mecanismul de rezistență MLSB (*macrolide-lincosamide-streptogramin B*), asociat cu rezistența inductibilă sau constitutivă la agenții MLSB.

Tulpinile care prezintă o rezistență constitutivă la MLSB (MLSBc) manifestă *in vitro* rezistență la toți acești agenți. Rezistența MLSB inductibilă se instalează după expunerea la un macrolid. Tulpinile cu rezistență MLSB inductibilă (MLSBi) prezintă *in vitro* rezistență la membrii grupului de macrolide cu 14 şi 15atomi de C (de exemplu, eritromicina) şi sunt sensibile la macrolidele cu 16 atomi de C, la lincosamide şi la steptograminele de tip B.

Datorită prevalenței* tulpinilor rezistente la antibiotice şi emergenței recente a izolatelor clinice rezistente la vancomicină, controlul infecțiilor este tot mai dificil.

* *Prevalența* semnifică numărul total al persoanelor infectate, cazuri vechi şi noi, într-o populație la un anumit moment. *Incidența* semnifică numărul cazurilor noi de infecție care apar într-o anumită populație într-un interval definit.

S. epidermidis. Patogenitatea rezidă în proprietatea de aderență la dispozitive protetice utilizate în clinică, prin intermediul adezinelor polizaharidice şi a materialului mucos (*slime*) format din acid teichoic solubil.

S. epidermidis produce foliculită, pneumonie, toxiinfecții alimentare, septicemie, osteomielită, sindromul de şoc toxic, infecții ale plăgilor chirurgicale, sindromul pielii opărite, cu manifestări asemănătoare febrei scarlatinoase, infecții asociate dispozitivelor cardiovasculare şi ortopedice.

Enterotoxinele au activitate proteazică, sunt difuzibile şi manifestă tropism faţă de mucoasa intestinală, fiind cauza frecventă a intoxicaţiilor alimentare. Au fost identificate 17 enterotoxine stafilococice (SEA...SEE şi SEG...SEQ). Au calitate de superantigene, se leagă de moleculele CMH II şi induc stimularea policlonală a limfocitelor T şi manifestările de sindrom de şoc toxic; prezintă numeroase variante antigenice şi sunt produse de 50% dintre tulpinile de *S. aureus*, atunci când contaminează produse alimentare bogate în glucide şi proteine.

Toxinele exfoliative/epidermolitice A şi B (produse de tulpinile de *S. aureus* ce aparţin grupului fagic II) sunt superantigene asociate cu sindromul pielii opărite (sindromul Ritter) (Lina et al., 2007; King et al., 2009). Sindromul cuprinde trei entităţi clinice (necroliza epidermală toxică, eritemul scarlatiniform şi impetigo – bube dulci) şi se manifestă prin febră, eritem şi blistere, care se pot rupe cu formarea unei zone dure de culoare roşie. Uneori copiii afectaţi prezintă o secreţie conjunctivală mucopurulentă.

Particularităţi fiziologice. Culturile cresc în *aerobioză*, stafilococii fiind facultativ *anaerobi*. Sinteza toxinelor este favorizată de creşterea în atmosferă de CO_2, 5–10%. Temperatura optimă de dezvoltare variază între 30–37°C, pH optim 7–7,5. Incubate timp de 16-18 ore, culturile în mediu lichid tulbură uniform mediul, iar culturile pe mediu solidificat se caracterizează prin apariţia coloniilor circulare (diametrul de 1 mm), bombate, opace, cu o consistenţă cremoasă, cu margini regulate, suprafaţa netedă, lucioasă, pigmentate în galben citrin. Cercetarea pigmentogenezei se face prin cultivare în prezenţa serului bovin coagulat, incubare timp de 27 de ore la 37°C şi apoi 24 ore la 25°C, la lumina zilei. Producerea coagulazei este importantă pentru identificare, iar producerea *catalazei* este importantă pentru diferenţierea de *Streptococcus* sp.

Rezistenţa la factori fizico-chimici. Stafilococii rezistă la uscăciune timp de săptămâni şi chiar luni în produse biologice uscate (puroi, spută), dar şi în praful de cameră şi chiar în nisipul plajelor. Sunt distruşi prin expunere la 60°C, timp de 30 minute, în prezenţa fenolului 5%, timp de 10 min. şi a alcoolului etilic de 70°, timp de 1 oră. Tolerează până la 9% concentraţie NaCl. Sensibilitatea la medicamente este variabilă. Rezistenţa la penicilină (de exemplu, meticilina) este foarte frecventă printre tulpinile de *S.aureus*.

Structura antigenică. Tulpinile care produc infecţii invazive sintetizează material capsular şi devin astfel rezistente la fagocitoză. Acidul ribitol-teichoic, derivat al acidului teichoic, este principalul antigen polizaharidic care conferă specificitate de specie pentru *S. aureus,* iar acidul glicerol-teichoic este caracteristic speciei *S. epidermidis*. Diferenţierea serologică a stafilococilor nu este necesară, identificarea tulpinilor de *S. aureus* făcându-se prin tipizare fagică.

Patologia este foarte diversă (fig. 64) (tabelul 9).

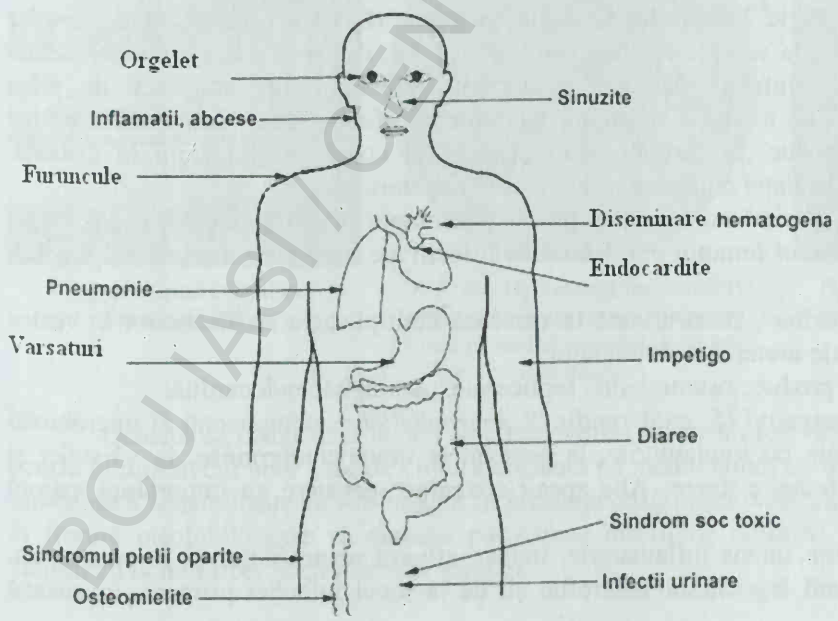


Fig. 64. Localizarea infecţiilor produse de *Staphylococcus* în organismul uman (după Todar, 2008).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 9.

Principalele tipuri de infecții determinate de *S. aureus* și factorii de virulență implicați

Tipul de infecție	Factori de colonizare	Invazine	Enzime extracelulare	Rezistența la fagocitoză	Eludarea efectorilor imunitari	Toxigeneza
Foliculite	Adezine	Stafilokinaza	Proteaze Lipaze Nucleaze Colagenaza Elastaze	Coagulaza Leucocidina	Coagulaza	Toxine citotoxice (hemolizine, leucocidină)
Pneumonie		Stafilokinaza Hialuronidaza	Proteaze Lipaze Nucleaze Colagenaza Elastaze	Coagulaza Leucocidina Hemolizine Carotenoizi Superoxid-dismutaza Catalaza Creștere la pH scăzut	Coagulaza Variație antigenică	Toxine citotoxice (hemolizine, leucocidină)
Toxiinfecții alimentare						Enterotoxine A-G
Septicemie (invazia sistemului circulator)		Stafilokinaza Hialuronidaza	Proteaze Lipaze Nucleaze Colagenaza Elastaze	Coagulaza Leucocidina Hemolizine Carotenoizi Superoxiddismutaza Catalaza Creștere la pH scăzut Proteina A	Coagulaza Variație antigenică Proteina A	Toxine citotoxice (hemolizine, leucocidină)
Osteomielite (invazia osului)	Adezine	Stafilokinaza Hialuronidaza	Proteaze Lipaze Nucleaze Colagenaza Elastaze	Coagulaza Leucocidina Hemolizine Carotenoizi Superoxiddismutaza Catalaza Creștere la pH scăzut Proteina A	Coagulaza Variație antigenică Proteina A	Toxine citotoxice (hemolizine, leucocidină)
TSS (*toxic shock syndrome*)						Toxina TSST; enterotoxine A-G
Infecții ale leziunilor chirurgicale	Adezine	Stafilokinaza	Proteaze Lipaze Nucleaze Colagenaza Elastaze	Coagulaza Leucocidina Hemolizine Carotenoizi Superoxiddismutaza Catalaza Creștere la pH scăzut Proteina A	Coagulaza Variație antigenică Proteina A	Toxine citotoxice (hemolizine, leucocidină)
Sindromul pielii pătate (analog febrei scarlatinoase)	Adezine	Stafilokinaza		Coagulaza Leucocidina Hemolizine	Coagulaza Variație antigenică Proteina A	Toxine exfoliative

S. aureus produce cele mai multe dintre infecțiile nosocomiale. În funcție de localizare, infecțiile stafilococice pot fi:

– la poarta de intrare – la nivelul tegumentului și mucoaselor: stafilococii cu tropism pentru țesutul cutanat aparțin grupului fagic 2 și produc foliculite profunde (furuncul), foliculite ale genelor (orgelet sau urcior), în care infecția se produce la nivelul foliculului, dar și al glandei perifoliculare, acneea pustuloasă, hidrosadenita (infecția glandelor sudoripare), impetigo, otite, conjunctivite, plăgi sau arsuri contaminate, infecții ale tractului respirator superior și inferior. Bacteriile elimină toxine codificate de plasmide care produc „sindromul pielii opărite" la copii, ca și leziuni la distanță, caracterizate prin distrugerea substanței cimentante și exfolierea epidermei;

– *enterocolita* pacienților spitalizați, mai ales postantibioterapie cu antibiotice de spectru larg;

– la nivelul *tractului genital* feminin pot determina infecții ale trompelor uterine (salpingite), ovarite și pelviperitonite;

– la nivelul aparatului *urinar*, staza urinară favorizează multiplicarea stafilococilor în vezica urinară și infecțiile ascendente ale ureterelor și rinichilor;

– tulpinile invazive pot produce osteomielită, septicemie, meningită, endocardită.

Stafilococii coagulazo-negativi (*S. epidermidis, S. saprophyticus*), componenți ai microbiotei normale, produc infecții asociate cu implanturile, la persoanele imunocompromise, la vârstnici și infecții ale tractului urinar la femeile tinere. Alte specii coagulazo-negative au importanță majoră pentru patologia veterinară.

Infecția stafilococică este intens inflamatorie, induce afluxul neutrofilelor și în consecință, piogenă. *S. aureus* scapă acțiunii fagocitelor neutrofile și, de la locul infecției primare, invadează

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Infecțiile tegumentare apar în special la adolescenți (acnee, furuncule) şi la pacienții tratați un interval de lungă durată cu corticosteroizi. Abcesele şi alte leziuni supurative se tratează prin drenaj şi terapie antimicrobiană.

S. saprophyticus este a doua cauză, după *E. coli,* a infecțiilor de tract urinar la femeia tânără.

Diagnosticul de laborator. Probele utilizate sunt puroiul, sângele, aspiratul traheal, LCR. Pe frotiuri se observă coci Gram pozitivi, dar *S. aureus* nu se distinge morfologic de *S. epidermidis.* Cultivarea pe mediu agarizat cu sânge generează colonii după 18 ore la 37°C. Hemoliza şi pigmentația apar după câteva zile la temperatura camerei (fig. 65). *S. aureus* (dar nu şi alte specii) fermentează *manitolul* (fig. 66). Probele se cultivă pe mediu cu 7,5% NaCl. În mediul salin creşte numai *S. aureus,* celelalte microorganisme fiind inhibate.

Testul *catalazei* se foloseşte pentru a detecta prezența *citocrom-oxidazei,* enzimă caracteristică bacteriilor aerobe. Eliberarea O_2 semnifică testul pozitiv.

Testul *coagulazei* se realizează prin amestecul plasmei de iepure sau al plasmei umane cu citrat, diluată 1:5, cu un volum egal cu cultură bacteriană dezvoltată în mediul lichid, incubat la 37^{0}C. Reacția este pozitivă dacă coagularea se produce în 1-4 ore (fig. 67). Ca martor se foloseşte amestecul de plasmă cu bulionul steril. De asemenea, evidențierea coagulazei libere se poate realiza pe medii speciale (mediul Baird Parker sau mediul *Coagulase Mannitol*) (fig. 69–69).

Fig. 65. Tulpini de *S. aureus* β-hemolitice şi α-hemolitice însămânțate în sector pe geloză- sânge.

Fig. 66. Detectarea fermentării manitolului pe mediul Chapman (stânga –negativ, dreapta- pozitiv) la *S. aureus.*

Fig. 67. Testul coagulării plasmei de iepure

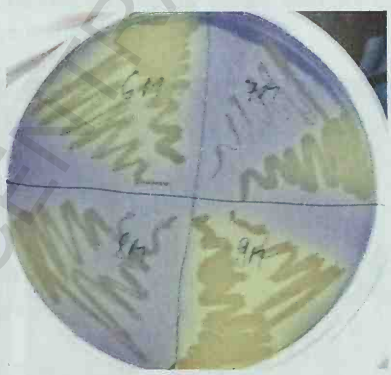


Fig. 68. Detectarea fermentării manitolului şi a prezenței coagulazei libere pe mediul *mannitol-coagulase* la *S. aureus.*

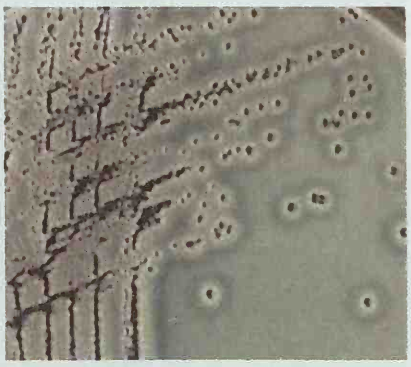


Fig. 69. Detectarea coagulazei libere pe mediul Baird Parker la *S. aureus.*

Detectarea coagulazei legate se poate realiza printr-un test rapid de aglutinare neimună, care constă în amestecul unei anse de cultură crescută pe mediu solid, cu o suspensie de particule de latex sau hematii sensibilizate cu fibrinogen. În prezența coagulazei parietale, fibrinogenul va fi transformat în fibrină insolubilă care va antrena particulele insolubile colorate, generând apariția unor grunji vizibili cu ochiul liber şi clarificarea soluției.

Fig. 70. Testul producerii DN-azei pe mediu cu ADN şi albastru de toluidină.

Termonucleaza stafilococică se evidenţiază pe geloză cu ADN cu sau fără albastru de toluidină. În geloză se decupează godeuri, în care se depun 5 µl cultură de *S. aureus* crescută în mediu lichid şi inactivată termic prin menţinere pe baie de apă la 100°C timp de 30 minute, iar hidroliza ADN este revelată fie prin precipitarea ADN cu HCl 1N (reacţia pozitivă constă în apariţia unui halou în jurul godeului după câteva minute), sau dacă mediul conţine albastru de toluidină, se va observa un halou roz în jurul godeului, în timp ce restul mediului rămâne colorat în albastru (fig. 70). Identificarea biochimică a diferitelor specii de *Staphylococcus* se poate realiza şi cu ajurorul galeriilor miniaturizate API (fig. 71) sau cu ajutorul sistemelor automate de identificare.

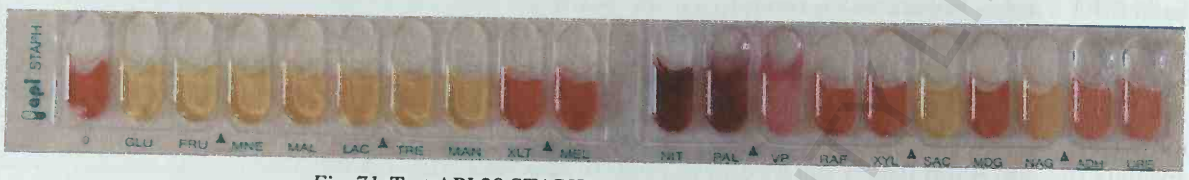


Fig. 71. Test API 20 STAPH caracteristic speciei *S. aureus.*

Testarea sensibilităţii la antibiotice se realizează sistematic pentru tulpinile izolate din infecţii cu simptomatologie clinică evidentă, pe mediu Müller Hinton. Rezistenţa la penicilină, mediată enzimatic se poate confirma prin testul cromogenic rapid (fig. 72), în timp ce rezistenţa la oxacilină, mediată neenzimatic, prin producerea unei proteine modificate care leagă penicilina (PBP2a) se poate detecta atât prin metode fenotipice (disc difuzimetrică, cu ajutorul discurilor de oxacilină sau de cefoxitin (fig. 74), prin diluţie în agar sau în mediu lichid a oxacilinei, prin E-test sau cu ajutorul mediilor cromogenice) sau moleculare (evidenţierea genei *mec*A). Rezistenţa la oxacilină implică raportarea rezistenţei pentru toate antibioticele β-lactamice, indiferent de rezultatele testării fenotipice, în timp ce sensibilitatea la oxacilină poate fi extrapolată pentru toate β-lactamicele.

Detectarea tulpinilor cu sensibilitate redusă la vancomicină necesită utilizarea unei metode cantitative care să permită stabilirea valorii CMI. De menţionat că doar tulpinile cu CMI ≥ 32µg/ml pot fi evidenţiate ca rezistente prin metoda clasică, disc difuzimetrică, în timp ce cele cu CMI <32µg/ml necestă o metodă cantitativă (CMI în mediu lichid sau E-test sau diluţie în agar) (CLSI, 2009, 2010) (fig. 73).

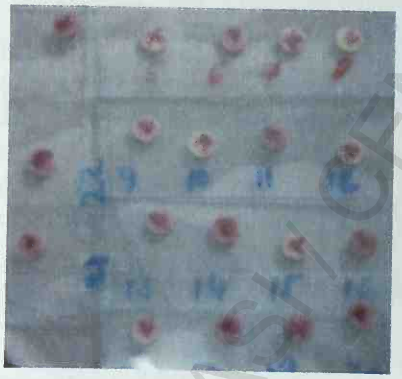


Fig. 72. Confirmarea producerii de penicilinază prin testul rapid de hidroliză a nitrocefinei cu generarea unui produs colorat în roşu.

Fig. 73. Testarea comparativă disc difuzimetrică şi prin E-test a sensibilităţii la vancomicină.

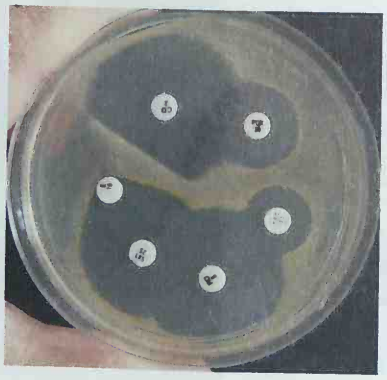


Fig. 74. Antibiograma de *S. aureus,* cu fenotip MLSb inductibil.

Tulpinile cu rezistenţă MLSB inductibilă (MLSBi) se evidenţiază prin plasarea alăturată a discurilor de eritromicină şi clindamicină. Apariţia unei zone de antagonism între cele două antibiotice indică fenotipul de rezistenţă inductibilă la lincosamide şi streptogramine B (fig. 74, 75).

Fig. 75. Tulpină de *S. aureus* cu fenotip de rezistenţă la meticilină, penicilină şi MLSBi.

Epidemiologie. Sursele de infecţie sunt leziunile umane, lenjeria contaminată, tractul respirator, tegumentul. Răspândirea prin contact direct este foarte importantă în spitale, unde personalul şi pacienţii sunt purtători de stafilococi în cavităţile nazale şi pe tegument. În spitale, riscul major de infecţie îl prezintă personalul de îngrijire a nou-născuţilor, unităţile de terapie intensivă, sălile de operaţie şi de chimioterapie antineoplazică.

Bibliografie selectivă

Fournier B., Philpott D. J. 2005. Recognition of *Staphylococcus aureus* by the Innate Immune System – Clin. Microbiol. Rev. 18: 521–540.

Dinges, M. M., Orwin, P.M., Schlievert, P.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus* – Clin. Microbiol. Rev., January 2000, 13: 16–34.

O'Riordan K., Lee J.C. 2004. *Staphylococcus aureus* Capsular Polysaccharides. Clin. Microbiol. Rev. 7: 218–234.

Bhakdi S., Tranum-Jensen J. 1991. Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Rev. 55(4): 733–751.

Brooks, G. F., Caroll, K. C. Butel J. S., Morse S. A. 2007. Jawetz, Melnick & Adelberg Medical Microbiology, 2007, 24th Edition, Mc Graw Hill – Lange International Edition.

Todd J. K. 1998. Toxic scock syndrome. Clin. Microbiol. Rev.: 432–446.

Buiuc D. şi Neguţ M. 2008. Tratat de Microbiologie medicală, ed. a II-a, Ed. medicală, Bucureşti

Cotar A. 2010. Teză de doctorat – Implicaţiile fenomenului de *quorum sensing and response* în exprimarea coordonată a factorilor de patogenitate şi virulenţă la tulpini de *Staphylococcus aureus* şi *Pseudomonas aeruginosa*

Archer G. L. 2001. *Staphylococcus aureus:* A Well-Armed Pathogen – Clinical Infectious Diseases. 26:1179–81.

Peacock S. J., de Silva, L., Lowy, F. D. 2001. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*?Trends Microbiol. 9:605–610.

Lowy F. D. 1998. *Staphylococcus aureus infections*. N Engl J Med. 339:520–535.

Bhatia, A., Zahoor S. 2007. *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: A Review. Journal of Clinical and Diagnostic Research.1(2):188–197.

Lina G., Gillet Y., Vandenesch F., Jones M. E., Floret D., Etienne J. 1997. Toxin Involvement in Staphylococcal Scalded Skin Syndrome. Clinical Infectious Diseases. 25:1369–73.

King, R. W., Saint Victor P. 2009. FACEP- Staphylococcal Scalded Skin Syndrome. Updated Jun 18, 2009. www.bact.wisc.edu/Bact303/pyogeniccocci.jpeg

Todar, K. 2008.Todar's Online Textbook of Bacteriology- www.textbookofbacteriology.net

WHO. 2003. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology, 2nd Edition WW.

Clinical Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptiblity test. M2A10, vol 29, no. 1

Clinical Laboratory Standards Institute. 2010. Surveillance for MRSA: principles, practices and challenges. A report. X07-R, vol. 30, no. 5
http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=16.

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C. A:, Krieger M., Scott M. P., Zipursky L., Darnell J. Molecular Cell Biology. 5th Ed.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6.2. Coci Gram pozitivi, catalază-negativi, de importanţă medicală. Familia Streptococcaceae

Reuneşte coci sau cocobacili grupaţi în tetrade sau lanţuri, anaerobi, microaerofili sau facultativ anaerobi, Gram pozitivi, catalazo-negativi, care fac parte din microbiota normală a tractului digestiv la om şi animale, au rol important în industria alimentară, ca prezervanţi, datorită produşilor de metabolism al glucidelor homo- (acid lactic) sau heterofermentativ (acid lactic, acid acetic, CO_2). Pot produce infecţii la om (tabelul 10), sau o stare fiziopatologică de sensibilizare. Streptococii eliberează o varietate de substanţe extracelulare şi enzime.

Tabelul 10

Caracteristicile speciilor de streptococi de importanţă medicală (după Brooks şi colab., 2007).

Specia	Antigenul Lancefield specific de grup*	Tipul de hemoliză (pe geloză cu 5% sânge de berbec, după 24 de incubare)**	Habitat	Caractere de laborator utile în identificare	Implicaţiile în patologia umană
Str. pyogenes	A	β	Piele, faringe	Colonii mari (> 0.5 mm), PYR (L-pirolidonil-2-naftilamidă)-pozitiv, sensibilitate la bacitracină	Faringită, impetigo, febră reumatismală, glomerulonefrită
Str. agalactiae	B	β	Tractul genital feminin	Hidroliza hipuratului, CAMP (Christie, Atkins, Munch-Peterson)-pozitive	Sepsis neonatal, meningită
Str. dysgalactiae subsp. *equisimilis*	C, G	β (cu implicaţii în patologia umană), α, γ	Faringe	Colonii mari (> 0.5 mm)	Faringită şi alte infecţii piogene similare celor produse de streptococii de grup A
Enterococcus faecalis (şi alţi enterococi)	D	Gama, alfa	Colon	Creşte în prezenţa sărurilor biliare, hidrolizează esculina, creşte în prezenţa de 6.5% NaCl, PYR-pozitiv	Abcese abdominale, ITU, endocardite
Str. bovis (non-*Enterococcus*)	D	Gama	Colon	Creşte în prezenţa sărurilor biliare, hidrolizează esculina, creşte în prezenţa de 6.5% NaCl, degradează amidonul	Endocardite, bacteriemii la pacienţii cu cancer de colon
Grupul *Str. anginosus* (*Str. anginosus*, *Str. intermedius*, *Str. constellatus*, grupul *Str. milleri*).	F (A, C, G) nontipabili	Alfa, beta, gama	Faringe, colon, tract genital feminin	Colonii mici (< 0.5 mm), cele de group A rezistente la bacitracină şi PYR-negative. Profiluri distincte de fermentare a zaharurilor	Infecţii piogene, inclusiv abcese cerebrale
Specii de streptococi viridans	Nontipabili	Alfa, gama	Cavitatea orală, faringe, colon, tract genital feminin	Rezistenţă la optochin, bilă. Profiluri distincte de fermentare a glucidelor	Cariogeneză (*Str. mutans*), endocardite, abcese polimicrobiene
Str. pneumoniae	–	Alfa	Faringe	Sensibil la optochin şi săruri biliare, reacţie pozitivă de umflare a capsulei	Pneumonie, meningită, endocardită
Specii de *Peptostreptococcus*	–	Gama, alfa	Cavitatea orală, faringe, colon, tractul genital feminin	Strict anaerobi	Abcese polimicrobiene

* Specificitatea serologică de grup a componentelor peretelui celular şi a altor antigene parietale sau capsulare a stat la baza schemei de clasificare a lui Lancefield (1936). Gruparea serologică în grupele Lancefield A-H şi K-U se face pe baza specificităţii antigenice a unui glucid aminat. Pentru streptococii grupului A, specificitatea antigenică este dată de ramnoză-N-acetilglucozamină; pentru grupul B – ramnoză-glucozamină; pentru grupul C – ramnoză-N-acetilgalactozamină; pentru grupul D – acidul glicerolteichoic – D-alanina şi glucoza; pentru grupul F – glucopiranozil-N-acetilglucozamina. Pe baza polizaharidului C din structura peretelui celular (N-acetilglucozamina şi ramnoza) s-au identificat 18 serogrupuri Lancefield la grupul A. Specificitatea antigenică a polizaharidului capsular se foloseşte pentru clasificarea tulpinilor de *S. pneumoniae* în mai mult de 90 de tipuri serologice şi pentru tipizarea streptococilor de grup B (*Str. agalactiae*);

** Liza completă a eritrocitelor, cu clarificarea zonei în jurul coloniei este denumită hemoliză β (fig. 76). Liza incompletă cu formarea pigmentului verde este denumită hemoliză de tip α (fig. 79). Alţi streptococi sunt nehemolitici sau γ-hemolitici, care nu produc hemoliză nici la suprafaţă şi nici în profunzimea agarului (fig. 78).

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Taxonomia numerică, tehnicile enzimatice şi metodele genetice au relevat o mare diversitate taxonomică în cadrul familiei *Streptococcaceae*.

Criteriile fenotipice au permis stabilirea a 12 genuri, şi anume: *Enterococcus*; *Lactococcus; Streptococcus*; *Alloiococcus*; *Globicatella*; *Helcococcus*; *Tetragenococccus*; *Vagococcus*; *Deinococcus; Abiotrophia; Pediococcus; Gemella,* separate după următoarele criterii: caracterele de cultură şi de colonie, morfologie, modul de grupare, mobilitate, diferite particularităţi biochimice (tipul de hemoliză), rezistenţa la factori fizico-chimici (producerea -pirolidonil –aril- amidazei, hidroliza esculinei, comportamentul în prezenţa sărurilor biliare, producerea de gaz din glucoză, capacitatea de a creşte în prezenta de NaCl 6%, la 10 sau 45°C, sensibilitatea la vancomicină), specificitatea serologică a antigenelor parietale şi habitat.

După criterii moleculare (ARNr 16S), genul *Streptococcus* este divizat în cinci grupuri:

grupul I: streptococii piogeni (*Str. pyogenes – grup A* (fig. 76, 77), *Str. agalactiae – grup B, Str. equi, Str. zooepidemicus* – grup C6). Mai nou, speciile de streptococi piogeni aparţinând serogrupurilor C şi G sunt grupate în aceeaşi specie cu două subspecii: *dysgalactiae* (*aureus*) (uman) şi *equisimilis* (animal);

grupul II: lactococii (streptococi de grup D, non *Enterococcus, Str. bovis* (necesită identificare rapidă – agent al endocarditelor, septicemiilor, neoplaziei de colon), *Str. equinus, Str. alactolyticus, Str. sacharolyticus*) (fig. 78);

grupul III: streptococii viridans (*Str. pneumoniae, Str. oralis, Str. sanguis* şi grupul *Str. milleri- Str. anginosus, Str. constellatus, Str. intermedius*) (fig. 79);

grupul IV: *Str. mutans*;

grupul V: *Str. salivarius, Str. vestibularis* şi *Str. haemophylus.*

Fig. 76. a. Lanţuri de streptococi în frotiul din supuraţie purulentă, colorat Giemsa (stânga); hemoliză completă (β-hemoliză) pe mediu cu sânge (mijoc); lanţuri de streptococi pe frotiu colorat Gram (dreapta) (Todar, 2008).

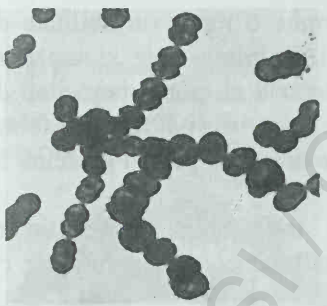


Fig. 77. Modul de grupare a celulelor de *Str. pyogenes* (după Todar, 2008).

Fig. 78. Streptococ γ hemolitic (după http://microamicrobes.blogspot.com/).

Fig. 79. Aspectul unei culturi de streptococ α hemolitic (http://microamicrobes.blogspot.com/).

6.2.1. *Streptococcus pyogenes*

Cei mai mulţi streptococi ce conţin antigenul de grup A aparţin speciei *Str. pyogenes* (β-hemolitic de grup A), component al microbiotei normale a tractului respirator superior (la mai puţin de 15% dintre indivizii umani). *Str. pyogenes* este prototipul patogenilor umani, care invadează local ţesuturile sau sistemic şi produce dezechilibre imunitare post-infecţioase.

SCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Streptococii din grupul A (β-hemolitici pe geloza cu sânge de berbec) sunt patogeni extracelulari, care produc o gamă variată de infecții la nivelul mucoaselor, tractului respirator (amigdalite, faringită, pneumonie), pielii şi țesuturilor profunde (impetigo/pioderma, celulite, fasciite necrozante), sindromul toxic streptococic, scarlatina, septicemie, meningită, maladii cu o componentă autoimună (afecțiuni alergice, sechele post-streptococice -febra reumatică, glomerulonefrita).

Infecțiile pot fi uşoare sau foarte severe, cu complicații (septicemia, pneumonia şi meningita) care pot evolua letal (fig. 80).

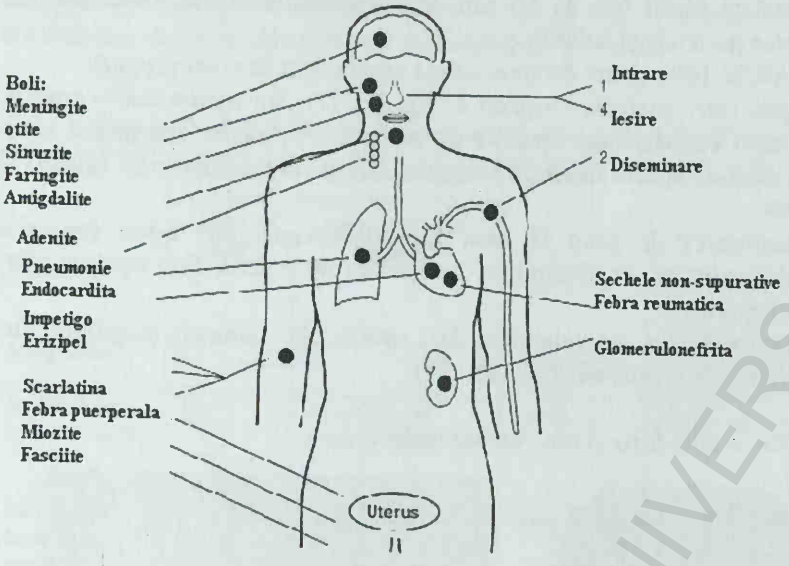


Fig. 80. Localizarea proceselor infecțioase streptococice şi entitățile clinice produse în organismul uman (după Todar, 2008).

Structura antigenică şi factorii de virulență

Proteina M este o moleculă majoră de suprafață şi un factor de virulență al streptococilor de grup A. Au fost identificate mai mult de 150 de serotipuri ale proteinei M. Datorită diversității antigenice, o persoană poate suferi infecții repetate cu *Str. pyogenes* grup A, cu variante distincte ale proteinei M. Proteina M apare sub forma unor proiecții fibrilare pe suprafața peretelui celular. Există două clase structurale majore de proteine M, clasa I şi II. Regiunea C-terminală este transmembranară, iar regiunea N-terminală este extracelulară. Regiunea extramembranară a proteinei M este un dimer cu structură suprahelicală α-helix. Organizarea pe domenii structurale permite o mare variabilitate de secvență şi variația antigenică, cu menținerea funcționalității moleculei. Tulpinile care sintetizează proteina M sunt virulente: în absența anticorpilor anti-proteină M, streptococii nu pot fi fagocitați de polimorfonucleare. Se pare că proteina M dar şi alte antigene parietale au rol în patogeneza febrei reumatice. Proteina M este prezentă şi la streptococii de grup G, iar gene omologe pentru proteina M au fost identificate la tulpini aparținând serogrupurilor C şi G.

Substanța T, termosensibilă şi acido-labilă, obținută după tratamentul proteolitic al streptococilor şi inactivarea proteinei M, permite diferențierea unor streptococi prin aglutinare cu seruri specifice;

Un alt antigen de suprafață identificat la streptococii de grup A este proteina R.

Extracția cu soluții slab alcaline a permis evidențierea unor alte substanțe cu slabă specificitate serologică denumită substanța P.

Toxine şi enzime. Str. pyogenes produce peste 20 de tipuri de molecule extracelulare (fig. 81):

– *streptokinaza* (fibrinolizina) transformă plasminogenul din plasma umană în plasmină, o enzimă proteolitică ce digeră fibrina şi alte proteine, imunogenă, utilizată în tratamentul emboliilor pulmonare, coronariene şi trombozelor venoase; streptokinaza a fost asociată cu patogeneza glomerulonefritei poststreptococice acute, probabil datorită capacității de a se lega la membrana bazală glomerulară şi de a activa plasminogenul, generând astfel nefritele.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- *streptodornaza* (o dezoxiribonuclează) depolimerizează ADN. *In vitro* scade vâscozitatea suspensiei de ADN; exsudatele purulente sunt vâscoase datorită acumulării deoxiribonucleoproteinelor, rezultate din liza tisulară. Amestecuri de streptodornaze şi streptokinaze sunt utilizate pentru lichefierea exsudatelor şi facilitarea pătrunderii antibioticelor şi a drenării puroiului şi ţesuturilor necrozate. Anticorpii anti DN-ază apar în infecţiile cutanate streptococice (> 100 unităţi).
- *hialuronidaza*, enzima care clivează acidul hialuronic din substanţa fundamentală a ţesutului conjunctiv şi favorizează diseminarea tisulară a agentului infecţios. Hialuronidaza este antigenică, are specificitate de tulpină şi induce sinteza anticorpilor specifici;
- *exotoxinele* streptococice eritrogene sau pirogene sunt binecunoscute pentru pirogenitatea lor, amplificarea simptomelor şocului toxic şi proprietăţile superantigenice; exotoxinele pirogene au omologie de secvenţă cu enterotoxinele stafilococice A şi C;
- *exotoxina eritrogenă* (toxina pirogenă) are 3 variante distincte antigenic: A, B, C. Exotoxina A este produsă de streptococii de grup A, lizogenizaţi cu un fag; exotoxina este asociată cu febra scarlatinoasă;
- *difosfopiridin-nucleotidaza* lizează leucocitele;
- *hemolizine*: streptolizina O (SLO) cu proprietăţi hemolitice în stare redusă (grupe – SH disponibile), rapid inactivată în prezenţa O_2. SLO este antigenică şi induce sinteza anticorpilor specifici (ASLO). Titrul mai mare de 160–200 U este indicatorul unei infecţii recente cu *Str. pyogenes* sau indică un nivel crescut al anticorpilor persistenţi, datorită unui răspuns imun de intensitate prea mare la o persoană hipersensibilă, ca rezultat al unei expuneri secundare la antigenele bacteriene; streptolizina S (SLS), *in vitro*, este β-hemolitică. Simbolul "S" semnifică stabilitatea acestei proteine-enzime în prezenţa oxigenului. Nu este antigenică.

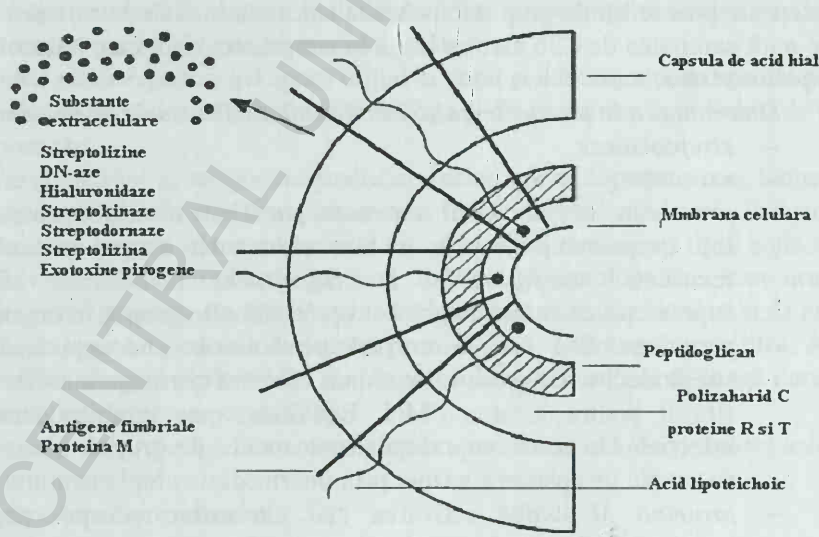


Fig. 81. Ilustrarea schematică a localizării celulare a factorilor de virulenţă la *Streptococcus* (după Todar, 2008).

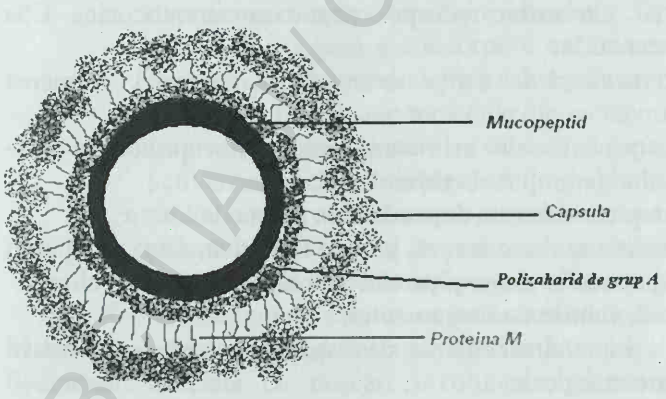


Fig. 82. Componentele antigenice extracelulare ale streptococilor de grup A (după Stool Miller şi Dorfman, 1996).

Etapele infecţiei streptococice

Aderenţa la celulele epiteliale este mediată de *adezine*. Cele mai importante adezine sunt proteina M şi acizii lipoteichoici (LTA), deoarece anticorpii specifici previn colonizarea bacteriană în organismul animal, cu efect protector faţă de infecţiile letale cu streptococi de grup A (fig. 82).

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

Fig. 83. Imagine electrono-optică a etapelor endocitării *Str. pyogenes* în celulele HEp-2 (după Todar, 2008).

Invazia intracelulară. Cercetările recente sugerează că streptococii de grup A nu numai că aderă la celulele epiteliale, dar le şi invadează. Streptococii de grup A au potenţialul de a invada celulele epiteliale umane cu frecvenţă egală sau chiar mai mare decât patogenii bacterieni intracelulari clasici, *Listeria* sp. şi *Salmonella* sp. (La Penta şi colab., 1994) (fig. 83). Raportul iniţial a stârnit un amplu interes şi a fost confirmat şi de alte cercetări. Invazia masivă presupune exprimarea *proteinei M şi/sau a proteinelor care leagă fibronectina,* precum SfbI. *Atât proteina M1 cât şi SfbI sunt considerate invazine pentru că particulele de latex învelite cu oricare dintre aceste proteine sunt internalizate eficient de celulele epiteliale.* În plus, mutaţii ale genelor care codifică pentru aceste proteine reduc capacitatea streptococilor de a invada celulele *in vitro.* Cele mai recente lucrări descriu invazia masivă a celulelor epiteliale, cu streptococi de grup A, serotip M1. În timpul procesului de invazie are loc rearanjarea componentelor citoscheletului. Semnificaţia invaziei celulelor gazdei nu este clară, deşi streptococii pot folosi mediul intracelular pentru a evita mecanismele de apărare ale gazdei. De aceea, internalizarea streptococilor poate duce la cronicizarea infecţiei.

Evitarea efectorilor imunitari ai gazdei

Capsula streptococilor de grup A este formată din *acid hialuronic*, un polimer cu unităţi repetitive de acid glucuronic şi N-acetilglucozamină (identic polizaharidului din umoarea vitroasă bovină şi din cordonul ombilical uman) (Stool Miler şi Dorfman, 1996), având rol antifagocitar şi fiind implicată în aderenţa de epiteliul faringelui, deoarece leagă CD44 de pe celulele epiteliale.

Legarea fibrinogenului şi a factorului H de activare a complementului la proteina M de pe suprafaţa streptococilor de grup A blochează calea alternativă de activare a complementului şi reduce foarte mult cantitatea de C3b care se leagă la streptococi, fapt care reduce fagocitoza streptococilor de către polimorfonucleare.

Diseminarea în ţesuturile gazdei este mediată de o serie de proteine şi enzime extracelulare:

- *streptokinaze*
- *exotoxine*
- *proteinaza streptococică sau exotoxina B* este o cistein-protează extracelulară produsă de toţi streptococii de grup A. Are efect toxic asupra macrofagelor, ceea ce determină rezistenţa streptococilor la fagocitoză, favorizează diseminarea bacteriană şi supravieţuirea extracelulară a streptococilor de grup A în organismul gazdă;
- *peptidaza C5a* este o enzimă proteolitică (endopeptidază), localizată pe suprafaţa streptococilor de grup A. Peptidaza clivează chemotaxina C5a derivată din complement la situsul pentru legarea PMN. Rezultatul este inhibiţia recrutării fagocitelor la locul infecţiei. De aceea, suprafaţa streptococilor de grup A constituie o barieră dublă pentru sistemele de apărare a gazdei prin intermediul complementului;
- *proteina M* inhibă activarea căii alternative şi apoi peptidaza streptococică C5a inactivează chemotaxia şi componenta C5a;
- *inhibitorul streptococic al lizei mediate de complement* inhibă, *in vitro,* formarea complexului de atac al membranei.

Răspunsul gazdei la infecţia streptococică constă în sinteza anticorpilor protectori anti-proteina M, inhibitori ai aderenţei ai streptococilor de grup A, la celulele epiteliale.

Patologie. Tabloul clinic al infecţiei streptococice este dependent de poarta de intrare.

Tulpinile *invazive* de streptococ β-hemolitic se disemineză, pe cale limfatică, difuz şi rapid în ţesuturi, cu supuraţie minimă. Din limfă, infecţia trece în sânge şi produce următoarele entităţi clinice:

- *erizipelul* streptococic, dacă poarta de intrare este tegumentul;
- *celulita*, o infecţie acută a pielii şi a ţesutului subcutanat, cu răspândire rapidă, consecutivă traumatismelor, arsurilor, inciziilor chirurgicale;
- *fasciita necrozantă* (gangrena streptococică), o infecţie a ţesutului subcutanat şi a fasciei, cu necroză extinsă şi progresie rapidă;

- *febra puerperală*, datorată infecției uterine postpartum, cu evoluție septicemică;
- *bacteriemia* (septicemia) consecutivă traumatismelor deschise sau inciziilor chirurgicale, poate fi rapid fatală.

Infecția invazivă cu streptococi de grup A poate să producă *sindromul de șoc toxic* și *febra scarlatinoasă.*

Sindromul de șoc toxic se caracterizează prin starea de șoc, bacteriemie, insuficiență respiratorie și a altor organe (ficat, rinichi). Moartea survine la 30% dintre pacienți. La persoanele sănătoase, infecția este consecutivă unor traume minore, la nivelul leziunilor se inițiindu-se infecția țesuturilor moi, fasciita necrozantă, miozita.

Febra scarlatinoasă este produsă de exotoxinele A-C pirogene, eliberate de *S. pyogenes* cu localizare faringiană. Faringita poate fi foarte severă. Erupția tegumentară apare pe trunchi în 24 de ore și implică ulterior extremitățile.

Infecțiile *locale* cu streptococ β-hemolitic produc:

- *faringita.* Bacteriile aderă la epiteliul faringian prin intermediul adezinelor (LTA și proteina M). Acidul lipoteichoic se fixează pe fibronectina care tapetează celulele epiteliale. La copii, infecția tractului respirator superior nu implică plămânul, dar se poate extinde în urechea medie și zona mastoidiană. La adolescenți și adulți, infecția este mai severă;
- *piodermita streptococică* (impetigo), o infecție locală a straturilor superficiale ale tegumentului, în special la copii, ce se manifestă prin apariția unor vezicule superficiale care se sparg. Este foarte contagioasă, în special în climatul cald și umed.

Sechele nonsupurative post-streptococice

După infecția acută cu *Str. pyogenes*, urmează o perioadă de latență de 1–4 săptămâni, după care evoluează nefrita sau febra reumatică. Aceste maladii nu sunt consecința directă a procesului infecțios diseminat, ci se datorează unei reacții de hipersensibilitate.

Glomerulonefrita acută poststreptococică apare inițial la copii și adolescenți, în special de sex masculin (raportul cazurilor de îmbolnăvire băieți/fete este de 2:1) și de asemenea la indivizii de peste 40 de ani cu condiții predispozante.

Caracteristicile glomerulonefritei acute poststreptococice includ edem, hipertensiune, hematurie, anomalii ale sedimentului urinar, nivel scăzut al complementului în ser și febră moderată. Perioada de latență între infecția streptococică și apariția glomerulonefritei este de 1–4 săptămâni, iar titrul anticorpilor antistreptococici anti-DN-ază B sau antihialuronidază este înalt. În cazul glomerulonefritei, care urmează piodermitei sau infecțiilor dermice, perioada de latență este de 3–6 săptămâni, iar titrul ASLO este în general scăzut. După infecțiile faringiene, perioada de latență poate fi de 1–2 săptămâni, iar titrul ASLO poate fi ridicat. Atacurile recurente ale glomerulonefritei nu provoacă de obicei sechele de lungă durată, în general leziunile rinichiului, având caracter temporar la copii.

Mecanismele potențiale ale patogenezei în glomerulonefrita acută poststreptococică sunt multiple:

- depunerea complexelor imune circulante;
- reacția încrucișată a anticorpilor cu antigenele glomerulare și streptococice (serul de la pacienții cu glomerulonefrită acută poststreptococică conține anticorpi anti-laminină, anti-colagen și față de alte molecule din membrana bazală glomerulară);
- lezarea țesutului glomerular sub acțiunea proteinazei sau streptokinazei streptococice;
- activarea directă a complementului în glomeruli (exotoxina B se concentrează în glomerul și activează complementul pe calea alternativă, pe de altă parte, capacitatea de legare a plasminei ar avea rol în penetrarea țesuturilor de către complexul exotoxina B-plasmină, unde excesul de plasmină poate activa complementul și produce inflamarea glomerulilor).

Febra reumatică este o sechelă tardivă a faringitei produse de streptococii de grup A. Manifestările maladiei sunt: inflamații ale articulațiilor (artrita), ale inimii (cardite), ale SNC (chorea Sydenham asociată cu mișcări involuntare, slăbiciune musculară și tulburări emoționale), ale tegumentului (*eritema marginatum* și/sau noduli subcutanați). Leziunile mușchiului cardiac și ale valvelor sunt cele mai grave. Unele tulpini de *Str. pyogenes* de grup A au antigene membranare care

reacționează încrucișat cu antigene ale țesutului cardiac. Serul pacienților cu febră reumatică conține anticorpi specifici față de acest grup de antigene. Febra reumatică se manifestă prin febră, frisoane, poliartrită migratoare nesupurativă, inflamația endo-, mio- și pericardului. Cardita duce la îngroșarea și deformarea valvelor și formarea unor granuloame mici în miocard. Febra reumatică are tendința marcată de reactivare, spre deosebire de nefrită.

Eritema marginatum este o erupție distinctă cu pustule roșii, caracteristică febrei reumatismale. *Nodulii subcutanați* apar pe suprafața încheieturilor și coloanei vertebrale ca și în *lupusul eritematos sistemic*.

Febra reumatismală are un mecanism autoimun și apare cel mai probabil după sinteza anticorpilor care reacționează încrucișat cu componente ale streptococilor de grup A și ale țesuturilor gazdei (miozina, tropomiozina și keratina, ADN, N-acetil glucozamina).

Artrita reactivă streptococică este nepurulentă și apare după infecția cu streptococi de grup A. Tratamentul cu aspirină sau salicilați nu este foarte eficace, spre deosebire de febra reumatismală, care este tratată cu doze înalte de aspirină.

Tulburări neurologice. Cercetări recente au evidențiat corelația între infecțiile cu streptococi de grup A și declanșarea unor tulburări obsesiv-compulsive (Allen și colab., 1995). Un subgrup de ticuri și comportamente obsesiv-compulsive la copii, precedate de infecții cu streptococi de grup A, au fost definite ca tulburări neuropsihice autoimune pediatrice asociate cu infecții streptococice (PANDAS). Pacienții cu PANDAS exprimă markerul DR8/17 cu aceeași rată ca și pe celulele DR^+ din sângele periferic al pacienților cu febră reumatismală (Swedo și colab., 1997).

Infecția streptococică induce creșterea titrului de anticorpi serici față de numeroase antigene: anti-DN-ază, anti-hialuronidază, anti-streptokinază, anti-proteină M. Cei mai importanți din punct de vedere practic sunt anticorpii anti-SLO (ASLO).

Rezistența la infecția streptococică are specificitate în raport cu varianta antigenică a proteinei M. După vindecarea infecției cu *Str. pyogenes* cu o anumită variantă a proteinei M, persoana devine rezistentă la reinfecția cu aceeași variantă, dar rămâne sensibilă față de toate celelalte variante antigenice ale streptococilor, conferite de proteina M. Anticorpii anti-proteină M opsonizează celulele bacteriene, care sunt fagocitate de polimorfonucleare. În absența anticorpilor opsonizanți, proteina M este chimiotactic negativă față de fagocite.

Anticorpii anti-SLO blochează hemoliza mediată de SLO, dar nu sunt protectori. Titrul crescut ASLO (mai mare de 250 U) denotă infecția recentă sau infecții repetate și se întâlnește în special la persoanele reumatice.

Epidemiologie. Sursa infecțioasă cu streptococi de grup A este o persoană purtătoare, cu infecție clinică sau subclinică, un purtător care elimină agentul infecțios din tractul respirator prin aerosoli, sau disemineză prin contact tegumentar direct.

Tratamentul de elecție este reprezentat de penicilină sau macrolide (eritromicina) care trebuie administrate precoce în infecțiile acute (înainte de ziua a 8-a de infecție), timp de 10 zile pentru a realiza sterilizarea bacteriologică a indivizilor și a preveni apariția complicațiilor tardive. Tratamentul cu antibiotice este de asemenea util pentru prevenirea reinfecției cu streptococi de grup A a pacienților cu febră reumatismală. Tratamentul cu antibiotice nu mai este eficient după instalarea complicațiilor tardive cu componentă autoimună.

6.2.2. *Streptococcus agalactiae* aparține grupului Lancefield B. Este β-hemolitic, pozitiv pentru testul CAMP (fig. 84, 85), component al microbiotei vaginale la 5–25% dintre femei. Infecția nou-născutului poate duce la septicemie fulminantă sau la meningită.

Unele bacterii posedă hemolizine incomplete, care pot induce formarea de pori în membrana eritrocitelor doar în prezența unei enzime solubile denumite *sfingomielinaza C*, secretată de tulpini de *S. aureus* β–hemolitice. Pentru detectarea factorilor CAMP sau CAMP-*like,* tulpinile de cercetat se însămânțează sub formă de striuri paralele pe geloză-sânge, iar perpendicular pe aceste striuri, la 8 mm distanță, se însămânțează o tulpină de *S. aureus* β– hemolitică. Prezența factorului CAMP este indicată de apariția unei zone sinergice, mărite, de hemoliză completă la extremitatea striurilor din vecinătatea tulpinii de *S. aureus* β–hemolitică, cu aspect de "săgeată", în timp ce pe restul lungimii striului de cultură se observă hemoliză incompletă sau chiar absența hemolizei.

Fig. 84. Test pentru evidenţierea producerii factorului CAMP la tulpini de *Str. agalactiae* (orizontal, în prezenţa unei tulpini de *S. aureus* α-hemolitice).

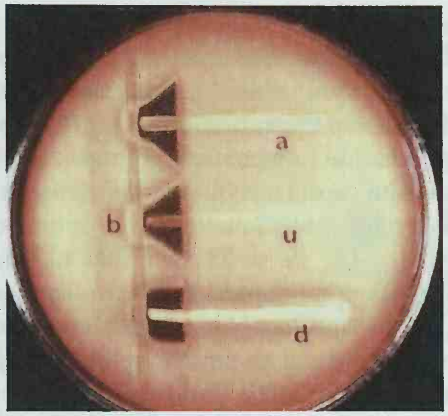


Fig. 85. Aspectul hemolizei sinergice indusă de diferite specii care produc hemolizine incomplete. Vertical: *S. aureus* producător de β-hemolizină; orizontal: (a) *Str. agalactiae* (CAMP-pozitiv), (u) *Str. uberis* (CAMP-*like* pozitiv), (d) *S. aureus* producător de δ-hemolizină (CAMP-*like* pozitiv) http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=16.

6.2.3. *Streptococii de grup C şi G* formează adesea pe geloză sânge colonii asemănătoare cu cele de *Str. pyogenes,* pot fi rezidenţi ai microbiotei orofaringiene şi pot produce faringite, sinuzite, bacteriemii şi endocardite.

6.2.4. *Streptococcus pneumoniae*

Str. pneumoniae a fost izolat în 1881. Este o bacterie Gram pozitivă, cu morfologie de lancedaţi, grupaţi în perechi (fig. 86) sau în lanţuri scurte, α-hemolitică, nesporulată, imobilă, catalazo-pozitivă. Celulele îmbătrânite se colorează Gram negativ şi ulterior se lizează spontan. Bila de bou (10%) sau dezoxicolatul de sodiu (2%) produc liza celulelor bacteriene crescute în bulion în câteva minute, probabil prin inactivarea inhibitorilor autolizinelor peretelui celular. Alţi streptococi viridans care produc hemoliză α nu se lizează şi astfel este posibilă diferenţierea. Se cultivă în atmosferă de CO_2 (5–10%). Pe mediul solidificat, coloniile sunt mici, sferice, α-hemolitice. La primele pasaje coloniile pot avea aspect mucoid datorită capsulei abundente. Fermentează glucoza cu formarea acidului lactic, care limitează creşterea.

Str. pneumoniae se găseşte în microbiota normală la o proporţie importantă a indivizilor umani (5–40%) şi poate produce bronşită, pneumonie, sinuzită, otită, bacteriemie, meningită. Capsula polizaharidică face posibilă identificarea cu antiser specific (fig. 87).

Str. pneumoniae este cea mai frecventă cauză a pneumoniei bacteriene comunitare, deoarece colonizează iniţial nazofaringele, apoi ajunge la plămân prin trompa lui Eustachio. Este a doua cauză a meningitei bacteriene şi otitei medii la copii, după *H. influenzae.*

Fig. 86. Frotiu din puroi cu *Str. pneumoniae*, colorație May Grünwald Giemsa (după Todar, 2008).

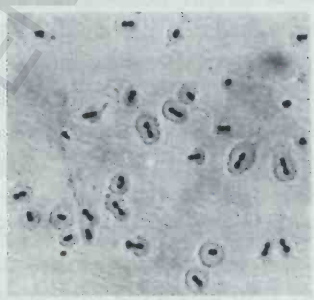


Fig. 87. Capsula la *Str. pneumoniae* (după Todar, 2008).

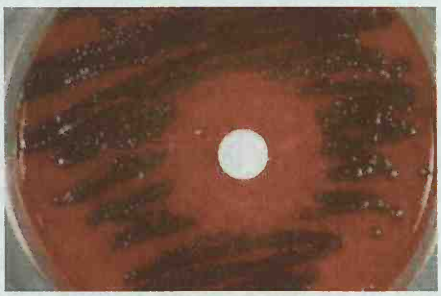


Fig. 88. Str. pneumoniae. Evidenţierea α hemolizei şi a zonei de inhibiţie din jurul discului impregnat cu optochin (după Todar, 2008).

Tulpinile care colonizează nazofaringele formează colonii transparente, iar cele invazive dau colonii transparente sau opace pe geloză-sânge. 20% dintre izolate sunt strict anaerobe.

Str. pneumoniae are sensibilitate înaltă la optochin (diametrul zonei de inhibiţie este mai mare de 16 mm), spre deosebire de alţi streptococi viridans, care sunt rezistenţi (fig. 88).

La suprafața celulei se găsesc 3 structuri majore: membrana plasmatică, peretele celular și capsula. Izolatele care sintetizează cantități mari de polizaharid extracelular formează colonii mari, mucoide. După câteva pasaje *in vitro*, celulele nu mai sintetizează polizaharidul capsular, dar redevin capsulate după inocularea la șoarece. Capsula constă din polimeri cu greutate moleculară mare, alcătuiți din unități repetitive de oligozaharide formate din 2–8 monozaharide. La unele serotipuri, fosforil colina este componentă a polizaharidului capsular. Polizaharidul capsular este legat covalent de peptidoglican și este distinct din punct de vedere antigenic pentru cele peste 90 de serotipuri capsulare de *Str. pneumoniae*. Serotipurile 6, 14, 18, 19 și 23 sunt cele mai frecvente (produc 60–80% din totalul infecțiilor clinice). Capsula este un important factor de virulență, tulpinile capsulate fiind de cel puțin 10^5 ori mai virulente decât tulpinile necapsulate (AlonsodeVelasqo și colab., 1995; Todar, 2008).

Reacția imună a polizaharidului cu anticorpii specifici din serul policlonal se evidențiază prin fenomenul de umflare a capsulei (reacția *Quellung*) și aglutinarea celulelor, datorită legării încrucișate a anticorpilor care formează punți intercelulare. Reacția este adeseori folosită pentru identificarea pneumococilor direct din spută sau din cultură.

Peretele celular are o structură tipic Gram pozitivă și este alcătuit în primul rând din peptidoglican. Polizaharidul asociat peretelui celular (PsaA) (fig. 89) este un acid teichoic, care conține resturi de fosforil-colină, legat de peptidoglican prin acidul N-acetilmuramic. Resturile de fosforil-colină sunt sensibile la amidaza N-acetilmuramic-L-alanină, o enzimă ce clivează peptidoglicanul în glican și catenele peptidice, pentru că hidrolizează legătura dintre Ala și acidul N-acetilmuramic. Enzima are rol în procesul diviziunii celulare, deoarece clivează peptidoglicanul și se numește *autolizină*, deoarece induce liza pneumococilor în faza staționară a culturii, reflectată în schimbarea morfologiei cu intruzia centrului coloniei. Autolizina este factor de virulență: mutantele negative pentru autolizină sunt mai puțin virulente decât cele sălbatice. Efectele autolizinei par să fie indirecte, mediate de eliberarea pneumolizinei din citoplasma pneumococului.

Acidul lipoteichoic sau antigenul Forssman este un acid teichoic asemănător cu polizaharidul peretelui celular, dar are componenta lipidică atașată covalent. Antigenul este inserat în membrana plasmatică prin jumătatea lipidică și conține fosforil-colină, prin intermediul căreia *Str. pneumoniae* aderă la receptorii de colină, ubiquitari pe suprafața celulelor animale (receptorul pentru PAF- factorul activator al plachetelor și proteina C-reactivă). Fosforil colina este prezentă și la alți patogeni (*Haemophilus sp., Pseudomonas sp., Neisseria sp.* și *Mycoplasma sp.*), fiind probabil implicată în invazie printr-un mecanism asemănător.

Antigenul Forssman este un inhibitor puternic al autolizinei, iar resturile de fosforil-colină sunt implicate în interacțiunea specifică cu enzima. În faza staționară, celulele de pneumococ eliberează antigenul Forssman. Pierderea acestui inhibitor al enzimei, urmată de activitatea autolizinei duc la liza peretelui celular.

Proteine. Pneumococul produce circa 500 de proteine de suprafață, dintre care unele au rolul de factori de virulență: proteaza ce hidrolizează IgA_1 și astfel interferă cu apărarea mucoaselor; neuraminidaza și hialuronat-liaza ce facilitează atașarea de celulele epiteliale, prin clivarea acidului sialic din glicolipidele și din gangliozidele gazdei; alte proteine ale suprafeței implicate în aderența pneumococului de celulele epiteliale și endoteliale. A fost descrisă o proteină (CpbA – *complement binding protein*) capabilă să lege complementul și factorul H, inhibând astfel activarea complementului și fagocitoza (Jedrzejas, 2001).

Pneumolizina este o proteină intracelulară, ce aparține familiei toxinelor activate de thiol. Nu este secretată, dar este eliberată prin liza celulelor bacteriene, sub influența autolizinei. Efectul toxic constă în formarea porilor transmembranari prin asocierea oligomerilor de pneumolizină. Rezultatul este liza celulei.

In vivo, pneumolizina stimulează eliberarea citokinelor proinflamatorii (TNFα și IL-1β) de către monocite, inhibă mișcarea cililor celulelor epiteliului respirator, iar *in vitro* lizează celulele epiteliale ale tractului respirator superior și alveolare, inhibă migrarea neutrofilelor și activitatea lor bactericidă, inhibă expansiunea clonelor de limfocite și sinteza Ac.

Pneumolizina activează calea clasică a complementului, în absența Ac specifici (anti-pneumolizină). Din acest punct de vedere, pneumolizina este asemănătoare proteinei de fază acută CRP (proteina C reactivă). După ce se leagă de resturile de fosforil-colină ale polizaharidului parietal,

CRP activează calea clasică a complementului prin legarea C1q. Pneumolizina leagă direct C1q. Activând complementul, pneumolizina amplifică procesul inflamator. Deoarece lizează celulele epiteliale ale tractului respirator, pneumolizina uşurează tranzitul pneumococului în sânge. Mutantele negative pentru pneumolizină sunt mai puţin virulente decât tulpinile de tip sălbatic.

Proteina A (PspA) (fig. 89) a suprafeţei pneumococului, probabil transmembranară, pare să inhibe activarea complementului şi astfel măreşte gradul de virulenţă a pneumococului.

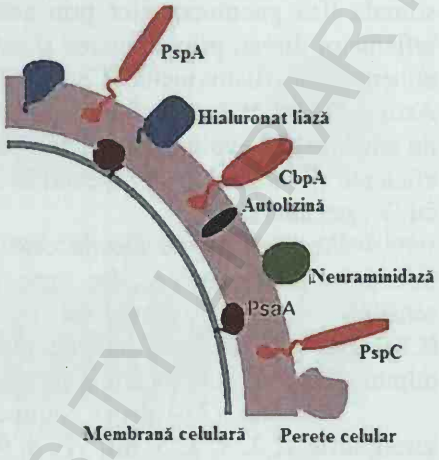


Fig. 89. Reprezentarea schematică a factorilor de virulenţă la *Str. pneumoniae* (după Jedrzejas, 2001).

Patogeneza. Str. pneumoniae colonizează în tractul respirator superior la mulţi indivizi sănătoşi. Scăderea rezistenţei organismului gazdă favorizează iniţierea procesului infecţios. Rezistenţa scade datorită unor cauze diverse:

- lezarea celulelor epiteliale ale tractului respirator datorită infecţiei virale sau altor infecţii;
- acumularea anormală a secreţiei mucoase (în stările alergice), care protejează pneumococul de fagocite;
- intoxicaţia cu alcool sau cu medicamente, ce supresează acţiunea fagocitelor şi reflexul de tuse;
- tulburări ale circulaţiei (congestia pulmonară, insuficienţa cardiacă).

Pneumococul se ataşează de o grupare dizaharidică a fibronectinei, componentă a matricei celulelor epiteliale faringiene.

Procesul patologic se datorează multiplicării bacteriei în ţesuturi. Pneumococul nu produce toxine. Virulenţa este atribuită diferitelor structuri, majoritatea situate pe suprafaţa celulei, care induc un puternic răspuns inflamator din partea gazdei, prezent în toate afecţiunile produse de pneumococi. Capsula este factorul major de virulenţă al *Str. pneumoniae*, deoarece este chimiotactic negativă pentru fagocite. Structura chimică a polizaharidului capsular condiţionează capacitatea diferită a serotipurilor de a supravieţui în sânge şi de a invada ţesuturile. Diferenţele biochimice ale numărului mare de serotipuri se reflectă în capacitatea de a activa calea alternativă a C, depunerea şi degradarea componentelor C pe capsulă, rezistenţa la fagocitoză, capacitatea de a induce sinteza anticorpilor.

Modificările proprietăţilor suprafeţei celulelor sau ţesuturilor pot influenţa virulenţa unui agent infecţios, direct proporţional cu amploarea modificărilor. *Str. pneumoniae* colonizează tractul respirator al circa 40% dintre indivizii umani, dar numai 0,5% fac pneumonie evidentă, otită medie sau septicemie. În plămânul uman, celulele de pneumococ care produc colonii opace şi respectiv transparente, nu par să aibă vreun avantaj unele faţă de altele în colonizarea ţesutului pulmonar. Dacă un virus infectează tractul respirator, citokinele care se sintetizează activează receptorul pentru factorul de activare plachetară (PAF) de pe suprafaţa celulelor epiteliale pulmonare. Aderenţa pneumococului de celulele epiteliului faringian uman creşte semnificativ după infecţia cu virusuri (virusul influenza, virusul respirator sincitial). Virusurile aderă la receptorul pentru PAF. Efectul stimulator asupra aderenţei este mediat de neuraminidaza virală, deoarece enzima clivează acidul sialic din glicosfingolipide, prezente în cantităţi mari în ţesutul pulmonar uman. Neuraminidaza expune alte molecule cu rol de receptori pentru aderenţa pneumococilor care formează colonii transparente. Astfel se explică predispoziţia crescută a pacienţilor infectaţi cu virusuri, pentru complicaţiile produse de pneumococi: septicemie şi meningită.

După liza celulelor epiteliale, pneumococii sunt translocaţi din nazofaringe în plămân şi produc pneumonie sau migrează direct în sânge şi produc bacteriemie sau septicemie. Cele mai multe infecţii nu sunt consecinţa portajului îndelungat, ci apar după dobândirea unui serotip nou, ceea ce înseamnă că procesul patologic este condiţionat de statutul imunitar al gazdei în momentul colonizării şi de virulenţa tulpinii. Ineficienţa mecanismelor protectoare ale epiteliului tractului respirator (sIgA, reflexul de tuse, secreţia mucoasă şi transportul ciliar) datorată efectelor pneumolizinei asupra cililor celulelor epiteliale, cât şi efectelor proteazei asupra IgA_1, poate uşura progresia infecţiei spre bronhii şi plămâni.

Din sânge, pneumococul migrează în meninge şi după lezarea endoteliului ajunge în spaţiul subarahnoidian.

Multiplicarea pneumococului în plămân, meninge sau în urechea medie este urmată de liza celulelor bacteriene, cu eliberarea componentelor parietale şi a pneumolizinei. Lizozimul poate stimula liza pneumococilor prin activarea autolizinei. Liza celulelor bacteriene activează procesul inflamator direct, prin atragerea şi activarea fagocitelor sau indirect, prin activarea complementului şi eliberarea anafilatoxinelor (C3a şi C5a). Inflamaţia determină morbiditatea infecţiilor cu pneumococ. Astfel se explică faptul că eliminarea pneumococului din focarul infecţios sub acţiunea antibioticelor nu ameliorează evoluţia procesului patologic. Deoarece lizează celulele bacteriene, antibioticele foarte eficiente (β-lactamice), în special în stadiile tardive, pot să amplifice efectele patologice ale infecţiei cu *Str. pneumoniae*.

Antibioticul de elecţie este penicilina G, administrată în doze ridicate pentru tratamentul infecţiei pneumococice, dar spre deosebire de streptococii β-hemolitici care şi-au conservat sensibilitatea la acest antibiotic, în cazul pneumococilor 5–10% dintre tulpini sunt înalt rezistente (CMI>2μg/mL) şi 20% moderat rezistente (CMI = 0.1–1 μg/mL). Au fost raportate de asemenea tulpini rezistente la tetraciclină şi eritromicină.

Vaccinul (23-valent) conţine antigenele a 23 de tulpini de *Str. pneumoniae* (25 mg din serotipurile 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F şi 33F) a redus cu 80–90% frecvenţa infecţiilor invazive) (Artz şi colab., 2003). Polizaharidele nu sunt imunogene la copiii sub 2 ani.

6.2.5. Genul *Enterococcus*

Denumirea de "enterococi" a fost dată de Thiercelin (1899), pentru a desemna originea intestinală a unui diplococ nou izolat, Gram pozitiv. În 1899, Mac Callum şi Hastings au raportat un caz de endocardită, cauzată de o bacterie pe care au denumit-o *Micrococcus zymogenes*. În 1906, agentul infecţios izolat din endocardită a fost denumit *Str. faecalis*, deoarece este caracteristic intestinului uman.

Genul *Enterococcus* reuneşte coci intestinali Gram pozitivi, facultativ anaerobi, cu aspect ovoid (fig. 90). Pe frotiuri sunt grupaţi în lanţuri scurte, perechi sau celule izolate.

Ca şi streptococii, enterococii nu au citocromi (de aceea sunt negativi pentru reacţia catalazei). Cele mai multe tulpini de *Enterococcus* cresc în medii cu 6,5% NaCl, pH 9,6, între 10–45°C, supravieţuiesc 30 minute la 60°C. Enterococii sunt foarte rezistenţi la condiţii limitative (concentraţii bactericide de SDS, săruri biliare, căldură, etanol, peroxid de hidrogen, aciditate, alcalinitate, UV, hipoclorit de Na). *E. faecalis* poate de asemenea să intre în stare de latenţă, viabilă, dar non-cultivabilă, revenind la starea activă metabolic în condiţii favorabile.

Enterococii fac parte din microbiota normală, fiind adaptaţi la mediul complex al cavităţii orale şi tractului gastrointestinal şi vaginal, bogat în nutrienţi, lipsit de O_2. Densitatea cocilor Gram pozitivi este de 10^5–10^7 UFC (unităţi formatoare de colonii) /gram de conţinut fecal la indivizii sănătoşi. Enterococii reprezintă mai puţin de 0,01% din microbiota normală.

În laboratorul clinic, genul *Enterococcus* se identifică pe baza caracterelor morfologice ale culturii şi ale celulelor pe frotiul colorat Gram, a capacităţii de a hidroliza esculina în prezenţa bilei şi de a creşte în mediu cu adaos de 6,5% NaCl. Un test rapid de identificare foloseşte esculină 0,2% în soluţie de NaCl 5% tamponată, testul fiind pozitiv pentru toate tulpinile de *Enterococcus* la 24 de ore (fig. 91).

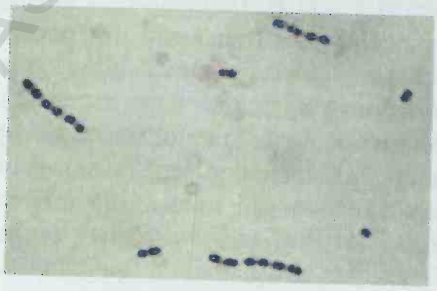


Fig. 90. Aspectul microscopic al enterococilor pe frotiu colorat Gram

Fig. 91. Aspectul creşterii culturii de *Enterococcus* sp. pe mediu bilă- esculină (BE) şi pe bulion cu 6.5% NaCl.

Pe geloză sânge formează colonii fine, galbene, gri, uscate, α/nehemolitice (fig. 92), pozitive pentru testul pirolidonil arilamidazei (PYR) (fig. 93). Pe geloză cu sânge de cal, incubată în atmosferă de CO_2, pot produce colonii β-hemolitice. Există de asemenea galerii miniaturizate de tip API, care pot diferenția între speciile de enterococi (fig. 94).

Fig. 92. Aspectul culturii de *Enterococcus* sp. pe geloză sânge.

Fig. 93. Testul PYR + (în dreapta, apariția culorii roșii).

Fig. 94. Aspectul galeriei API 20 Strep pentru *E. faecium*.

Genul *Enterococcus* cuprinde 17 specii, dintre care cele mai frecvent izolate în clinică sunt: *faecalis, faecium* (specii în general imobile), *caseliflavus, gallinarum* (specii mobile), *avium, durans, malodoratus.*

Enterococii sunt o cauză frecventă a unei varietăți de infecții umane purulente. *E. faecalis* produce 80–90% din totalul infecțiilor enterococice, iar *E. faecium* produce majoritatea celorlalte tipuri de infecții (Kayaoglu and Ørstavik, 2004). Cele mai frecvente sunt infecțiile abdominale purulente, apărute consecutiv unor leziuni ale tractului digestiv. *Enterococcus* poate produce infecții ale tractului urinar, septicemii, endocardite, infecții ale tractului biliar, ale rănilor provocate de arsuri și asociate cateterelor intravasculare. Enterococii pot infecta SNC, plămânii, țesuturile moi, sinusurile paranazale, urechea medie și internă, ochiul și, mai rar, țesutul periodontal.

Pentru a fi patogeni, trebuie să adere la țesuturile gazdei. În timpul invaziei tisulare, enterococii întâlnesc medii foarte diferite de cele ale colonizării, cu potențial redox mai mare, cantitate limitată de nutrienți esențiali, cu aflux de leucocite fagocitare și cu alte mecanisme de apărare.

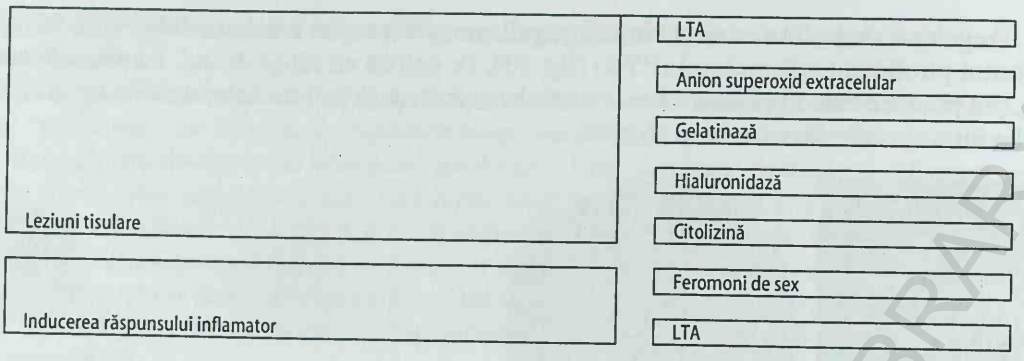
În acord cu modelul *translocației*, enterococii aderă la celulele epiteliale ale mucoasei colonului. Cocii aderenți la suprafața apicală sunt endocitați de celulele epiteliale sau de leucocitele intraepiteliale. Bacteriile translocate din lumenul intestinal sunt transportate prin limfă la ganglionii limfatici mezenterici, proliferează și diseminează pe cale sanguină la distanță. Infecțiile experimentale la animale de laborator diseminează sistemic în țesuturi și produc abcese. Sursa bacteriană enterococică pentru endocardită sau pentru bacteriemie este tractul urinar, infecția tractului urinar fiind cea mai comună localizare a enterococilor, mai ales la pacienții spitalizați, la care produc complicații cum ar fi prostatita enterococică și abcesele perinefrice.

Tabelul 11.

Factori de virulență identificați la E. faecalis și rolul acestora în evoluția procesului infecțios (Kayaoglu and Ørstavik, 2004).

Rolul	Factorul de virulență
Aderență și colonizare	Substanță de agregare (AS)
	Alte adezine de suprafață
	Acid lipoteichoic (LTA)
Rezistența la mecanismele de apărare a gazdei	AS
	Citolizină
	AS-48
Inhibarea altor specii bacteriene	Alte bacteriocine

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



Enterococii exprimă molecule cu rol de adezine la celulele gazdei şi de matricea extracelulară, ceea ce le permite să invadeze ţesuturile şi să formeze abcese (AS, LTA), să elibereze toxine şi factori imunomodulatori (tabelul 11).

AS este o adezină proteică codificată plasmidial care mediază contactul între o celulă receptoare şi una donoare de material genetic, facilitând transferul de material genetic (fig. 95).

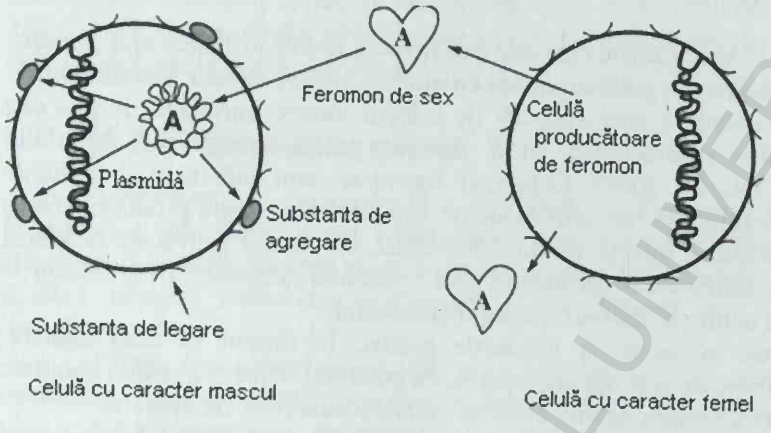


Fig. 95. Reprezentarea schematică a mecanismelor de comunicare intercelulară, bazate pe feromoni, care au loc în procesul conjugării (Murray, 1998).

AS este secretată de celula donoare, în timp ce celula receptoare secretă o substanţă de legare (BS- *binding substance*), codificată cromosomal. Complexul AS-BS are calitate de superantigen. AS mediază de asemenea şi aderenţa enterococilor la o serie de tipuri de celule eucariote, inclusiv neutrofile şi la moleculele matricei extracelulare.

Adezinele de suprafaţă (*Enterococcus surface protein*) sunt proteine cu greutate moleculară mare identificate mai ales la tulpinile izolate din infecţii.

Feromonii de sex sunt peptide mici de semnalizare (7–8 aminoacizi) secretate în mediu de celulele receptoare de material genetic, care induc secreţia de AS de către celula donoare.

Acizii lipoteichoici (LTA) sunt adezine neproteice, care mediază aderenţa enterococilor la diferite tipuri de celule eucariote (plachete, eritrocite, limfocite, PMN, cellule epiteliale), stimulează sinteza citokinelor proinflamatorii (IL-1 β, IL-6, IL-8), PGE2, VEGF şi induc apoptoza celulei gazdă. LTA inhibă de asemenea autoliza celulelor bacteriene în prezenţa antibioticelor β-lactamice. Acest efect explică sensibilitatea redusă a enterococilor la unele antibiotice administrate parenteral (cefalosporine), care predispun la infecţiile cu enterococi şi sunt in mod considerabil asociate cu bacteriemia enterococică (Jett şi colab., 1994). Cantitatea de LTA se dublează în forma VBNC.

Unele tulpini, mai ales cele izolate din bacteriemii sau endocardite, produc *anionul superoxid* în mediul extracelular, cu efect litic asupra celulelor eucariote şi a unor specii bacteriene (de exemplu, bacteriile anaerobe).

Gelatinaza şi hialuronidaza, metaloproteaze extracelulare cu Zn, sunt implicate în distrugerea ţesuturilor şi generarea răspunsului inflamator.

Citolizina determină liza hematiilor, PMN şi macrofagelor, în special în condiţii de anaerobioză, dar exercită şi efect de bacteriocină manifestat preferenţial pe bacterii Gram pozitive,

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

favorizând modificarea compoziției microbiotei normale și colonizarea cu bacterii Gram negative. Genul *Enterococcus* secretă și alte bacteriocine denumite BC-48, EJ97, 1071A, 1071B, SE-K4, 4, enterocinele 226NWC și EFS2, bacteriocinele 31 și 21.

AS-48 este un antibiotic peptidic codificat plasmidial cu un spectru larg de activitate antimicrobiană față de bacterii Gram pozitive și Gram negative.

Enterococii prezintă rezistență naturală la multe grupe de antibiotice: cefalosporine, peniciline rezistente la penicilinază, monobactami, sulfonamide, sensibilitate intermediară sau rezistență la fluoroquinolone. Ampicilina are efect bacteriostatic. Enterococii sunt de asemenea rezistenți la lincosamide (clindamicină și lincomicină) și au o rezistență de nivel scăzut la aminoglicozide (streptomicină, kanamicină, gentamicină) (CMI< 500 μg/mL). Asocierea dintre un β-lactamic sau glicopeptid (care acționează asupra peretelui celular) și un aminogliozid este esențială pentru tratamentul infecțiilor grave cu enterococ, cum sunt endocarditele, datorită acțiunii sinergice a acestor antibiotice. Sinergismul nu mai acționează însă în cazul tulpinilor cu rezistență de nivel înalt la aminoglicozide (CMI> 500 μg/mL), apărută ca urmare a dobândirii prin tranfer orizontal a genelor ce codifică enzime inactivatoare ale aminoglicozidelor (tabelul 12). Rezistența dobândită este rezultatul mutațiilor ADN sau stabilizării unui fragment de ADN exogen conjugativ. La *Enterococcus* funcționează 3 sisteme de transfer conjugativ:

- plasmidele cu spectru larg de gazdă se pot transfera între tulpinile de *Enterococcus*, dar și la specii de *Staphylococcus* (*S. aureus*), *Lactobacillus* sp., *B. subtilis*. Transferul este dependent de contactul intercelular strâns pe filtrele de membrană și este ineficient în bulion. Transferul plasmidelor cu spectru larg de gazdă a fost sugerat de faptul că *Staphylococcus* și enterococii au multe gene de rezistență comune (la gentamicină, eritromicină, penicilinază);
- plasmidele cu spectru îngust de gazdă (găsite numai la *E. faecalis*), ce se transferă cu o frecvență înaltă în mediu lichid (bulion), ca răspuns la factori de *quorum sensing*, care au ca efect agregarea caracteristică și vizibilă a celulelor donoare și receptoare de material genetic;
- transpozonii conjugativi mediază transferul ADN cu o frecvență scăzută, pe filtre. Cel mai cunoscut este Tn 916, ce mediază rezistența la tetraciclină (Murray, 1990).

Tabelul 12.

Spectrul enzimelor inactivatoare ale aminoglizozidelor (după Brooks și colab., 2007).

	Aminoglicozid			
Enzima	**Streptomicină**	**Gentamicină**	**Tobramicină**	**Amikacină**
6-Adeniltransferază	+	–	–	–
3'-Fosfotransferază	–	–	–	+
6'-Acetiltransferază	–	–	+	
4'-Adeniltransferază	–	–	+	±
2'-Fosfotransferază/6'-acetiltransferază	–	+	+	+

Utilizarea frecventă a vancomicinei în tratamentul infecțiilor cu coci Gram pozitivi, ca și utilizarea unor antibiotice înrudite, ca promotori de creștere în hrana animalelor (de exemplu, avoparcina) a condus la emergența în mediul spitalicesc a enterococilor rezistenți la vancomicină (*vancomycin-resistant enterococci* - VRE).

Diferențierea enterococilor la nivel de specie este importantă pentru detectarea tipului de rezistență la vancomicină și pentru diferențierea rezistenței intrinseci (*van*C) (netransferabilă) sau dobândite (*van*A sau *van*B) (transferabilă). *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. raffinosus*, *E. avium*, *E. durans* prezintă rezistență dobândită (*van*A- rezistență de nivel înalt, CMI Van >128 μg/ml, CMI Tec ≥16 μg/ml, *van*B- CMI Van 16–64 μg/ml, CMI Tec ≤1 μg/ml, *van*C, *van*D-CMI Van 64–128 μg/ml, CMI Tec 4–8 μg/ml și *van*E), *în timp ce E. gallinarum* și *E. casseliflavus/E. flavescens* (specii producătoare de pigment galben, caracteristic) au rezistență intrinsecă, de nivel scăzut, la vancomicină, codificată de gena van C, cu valori CMI Van scăzute (2–16 μg/ml).

Cel mai studiat determinant de rezistență la vancomicină este operonul vanA, localizat pe o plasmidă autotransferabilă care conține un transpozon înrudit cu Tn*1546*.

6.2.6. Alte genuri şi specii de streptococi

Streptocococii viridans (*Str. mitis, Str. mutans, Str. sanguis* etc) sunt α-hemolitici sau nehemolitici, componenți ai microbiotei normale a tractului respirator superior. Pot ajunge în sânge prin traumatisme şi produc endocardita pe valvele cardiace anormale. Din acest motiv, în cursul intervențiilor chirurgicale la nivelul tractului respirator, gastrointestinal sau urinar, se administrează agenți antimicrobieni la persoanele care au deformări ale valvelor cardiace. *Str. mutans* sintetizează cantități mari de polizaharide din sucroză (levan, dextran) şi inițiază procesul cariogen.

Genul *Peptostreptococcus* sp. creşte numai în anaerobioză sau microaerobioză şi uneori produc hemolizine. Sunt membri ai microbiotei cavității orale, a tractului respirator superior, a tractului genital feminin, a colonului. Se poate izola din infecțiile anaerobe mixte: răni, endometrită post-partum.

Genul *Globicatella*, cu o singură specie *sanguis*, este înrudit filogenetic cu *Aerococcus* şi se aseamănă cu enterococii, dar sunt sensibili la vancomicină. Este izolat de la pacienți cu bacteriemie, cu infecții ale tractului urinar, meningită.

Genul *Lactococcus* – cu mai multe specii şi subspecii, reuneşte coci aparținând serogrupului Lancefield N, homofermentativi, asemănători cu enterococii dar nu se dezvoltă la 45 grade C. Produc bacteriemii, infecții de tract urinar (cistite), endocardită subacută, pneumonii, infecții cutanate, apendicite, abcese cerebrale.

Genul *Leuconostoc* – cu mai multe specii, cuprinde cocobacili homofermentativi, asemănători din punct de vedere al caracterelor de colonie cu streptococii *viridans,* izolați din infecții parodontice, de cateter, bacteriemii, septicemii la gazde imunodeprimate, meningite cu evoluție gravă cauzată de rezistența intrinsecă la vancomicină

Genul *Streptococcus milleri* poate produce infecții supurative, abcese cerebrale, infecții ORL, cutanate, genitale, pleuropulmonare.

Alți streptococi orali sunt agenți principali ai endocarditelor infecțioase.

Streptococii de grup D grupați în specia *S. bovis* produc adesea infecții abdominale la pacienții cu neoplazii de colon.

Genul *Vagococcus* cuprinde lactococi mobili, de grup N, izolați în cazuri rare de la pacienți cu bacteriemii, peritonite. Se prezintă sub formă de coci în perechi sau tetrade, catalazo –negativi.

Genul *Gemella* cuprinde 2 specii, cu morfologie de coci în perechi, tetrade, grămezi sau lanțuri scurte, Gram-variabili, izolați din cazuri clinice de bacteriemii la bolnavi cu endocardită, meningite, şi din lichidul sinovial al bolnavilor cu artrite.

Genul *Helcococcus* produce infecții ale plăgilor, ulcere cutanate şi mastite, infecții de chist sebaceu, infecții supraadăugate ale rănilor.

Genul *Pediococcus* produce supurații abdominale, salivă, scaun, urină, bacteriemii, septicemii, abcese abdominale, abcese hepatice, endocardite, peritonite, infecții de cateter.

Genul *Tetragenococcus* cuprinde tulpini care nu au fost izolate la om. Sunt coci grupați în perechi sau tetrade cu acțiune catalazică slabă.

Genul *Aerococcus* produce bacteriemii la bolnavi cu endocardite, infecții de tract urinar, lichid sinovial la pacienții cu artrită septică, meningite.

Genul *Alloiococcus* produce otite, bacteriemii.

Genurile *Abiotrophia* şi *Granulicatella* reunesc streptococi defectivi auxotrofi pentru vitamina B_6 şi cisteină, anterior numiți *Str. defectives, Str. adjacens* şi specii adiționale; produc cromofori; sunt PYR (+); au aspect pleomorf, sunt Gram variabili, pseudo-bacilari, izolați sau rar în lanțuri (fig. 96). Se dezvoltă doar pe medii cu factori de creştere sau ca şi colonii satelite în jurul coloniilor de *S. aureus* (fig. 97). Produc endocardite; sinuzite; afecțiuni paradontotice; osteomielite; abcese cerebrale; meningite; endoftalmite.

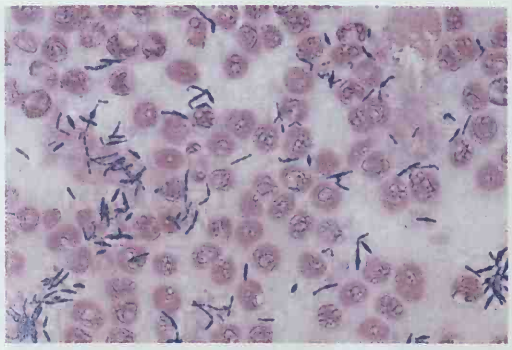


Fig. 96. Aspectul pseudobacilar al streptococilor defectivi din genul *Abiotrophia* (http://bacterioweb.univ-comte.fr/photo2detail.php?id=221).

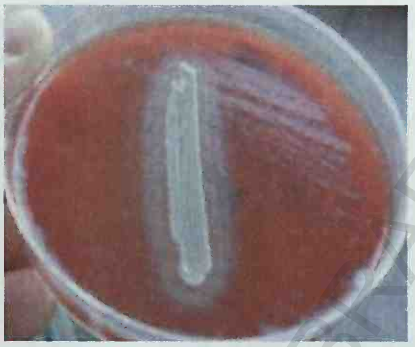


Fig. 97. Fenomenul de satelitism – creşterea în cultură fină a streptococilor defectivi în jurul striului de cultură de *S. aureus* 25923 însămânţat pe mediu Muller Hinton cu 5% sânge de berbec (http://www.scielo.org.ar/img/revistas/ram/v38n3/3a13f1.jpg).

6.2.7. Diagnosticul bacteriologic al infecţiilor streptococice presupune parcurgerea următoarelor etape:

- examinarea microscopică a frotiurilor realizate direct din produsul patologic care relevă coci Gram pozitivi, izolaţi sau grupaţi în diplo sau în lanţuri de lungimi variabile;
- izolarea agentului patogen din produsele patologice după însămânţare pe geloză sânge;
- examinarea caracterelor de colonie şi a tipului de hemoliză; se recomandă utilizarea gelozei cu 5% sânge de berbec şi incubarea în anaerobioză sau înţeparea mediului în profunzime cu ansa, pentru a favoriza dezvoltarea în anaerobioză. Geloza cu sânge de berbec trebuie preparată folosind un mediu de bază cu conţinut scăzut în glucoză sau fără glucoză (*Tryptic Soy Agar – TSA*), deoarece fermentarea glucozei şi acidifierea ulterioară a mediului inhibă producerea hemolizinelor. Geloza cu sânge de berbec revelează hemoliza produsă de *Haemophilus* sp. şi inhibă hemoliza produsă de *E. faecalis var. zymogenes* care poate apărea pe medii cu hematii de altă proveniență. Pentru a uşura observarea β-hemolizei, pe striul iniţial de însămânţare se poate depune un disc de SXT sau de bacitracină de concentraţie mică (0.02–0.05 UI). Deoarece foarte multe specii care ocupă acelaşi habitat sunt sensibile la SXT, iar *Str. pyogenes* este rezistent, în jurul discului de biseptol vor creşte doar coloniile β-hemolitice care se evidenţiază mai uşor. De asemenea, orice zonă de inhibiţie apărută în jurul discului de bacitracină de concentraţie joasă este revelatoare pentru *Str. pyogenes*. Pentru identificarea *Str. pyogenes* nu se folosesc discurile de bacitracină utilizate în antibiograma clasică cu încărcătură de 10 UI. După o primă citire realizată la 18 ore de incubare, plăcile sunt incubate în continuare şi citite la 48 de ore pentru a permite dezvoltarea coloniilor mici (0.5–2 mm diametru), β-hemolitice. Coloniile mici, chiar dacă aglutinează cu serul anti-A, nu vor fi raportate ca *Str. pyogenes*. În schimb, prezenţa coloniilor mari de *Str. pyogenes* trebuie raportată semicantitativ (colonii rare, +, ++ sau +++). În general, în faringitele acute, cultura de *Str. pyogenes* obţinută din exsudatul faringian este masivă, ocupând întreaga suprafaţă a mediului, în timp ce la purtători, numărul de colonii este < 20 (WHO, 2003);
- streptococii β hemolitici din grupul serologic A sunt sensibili la bacitracină (diametrul zonei de inhibiţie a creşterii este mai mare de 10 mm) (fig. 98) şi rezistenţi la SXT. Streptococii din serogrupurile C, F şi G sunt rezistenţi la bacitracină (rezistenţă nativă) şi sensibili la SXT;
- testul catalazei este util pentru diferenţierea streptococilor catalazo-negativi de stafilococii catalazo-pozitivi;
- testul creşterii pe medii cu 6,5% NaCl util pentru identificarea enterococilor care sunt halotoleranţi;
- testul la optochin. *Str. pneumoniae* este sensibil la optochin care determină o zonă de inhibiţie a creşterii mai mare de 16 mm (fig. 99);
- testul sensibilităţii la dezoxicholat de Na 10% pozitiv pentru *Str. pneumoniae* (fig. 100);

– identificarea biochimică cu ajutorul galeriilor de indentificare biochimică tip API 20 Strep (fig. 101), Rapid ID 32 Strep System, sisteme automate de tip Vitek I, Vitek II, Phoenix etc., este utilă pentru diagnosticul streptococilor beta-hemolitici non A, non B, enterococilor şi streptococilor viridans.

Fig. 98. Streptococi β-hemolitici sensibili la bacitracină (cadran stânga sus) şi rezistenţi la bacitracină (cadran dreapta sus).

Fig. 99. Streptococi α-hemolitici sensibili la optochin (stânga).

Fig. 100. Str. pneumoniae. Testul pozitiv la bilă după adăugarea de deoxicolat Na 10% (după Todar, 2008).

Fig. 101. Aspectul galeriei biochimice API 20 Strep pentru *Str. pyogenes.*

Fig. 102. Testul latex-aglutinării pentru evidenţierea serogrupului streptococilor β-hemolitici.

Diagnosticul imunologic se poate realiza prin:

– reacţii de latex – aglutinare pe lamă, rapide şi economice, cu o bună sensibilitate şi specificitate pentru determinarea serogrupului streptococilor β-hemolitici (cu ajutorul truselor cu antiseruri anti A, B, C, F şi G) (fig. 102) sau antigenelor capsulare pneumococice, din cultură sau direct din produsul patologic;
– testul ASLO – determinarea titrului de anticorpi anti-SLO;
– teste imunoenzimatice (ELISA).

Testarea sensibilităţii la antibiotice nu este necesară pentru streptococii β-hemolitici cu colonii mari de grup A, B, C şi G, pentru care antibioticul de elecţie este penicilina. La pacienţii alergici la penicilină cu risc scăzut de anafilaxie se recomandă cefazolinul, iar pentru cei cu risc înalt, eritromicina sau clindamicina, care însă trebuie testate în prealabil prin metoda disc difuzimetrică, în cazul streptococilor de grup B. La aceştia rezistenţa inductibilă la clindamicină poate fi detectată prin testul dublei difuzii, prin plasarea alăturată a discurilor de eritromicină şi clindamicină (fig. 103).

Streptococii β-hemolitici cu colonii mici de grup A, B, C şi G (din grupul *anginosus*, anterior *milleri*) sunt trataţi ca streptococi viridans (care includ şi grupurile *bovis, mutans, salivarius* şi *mitis*), pentru care se recomandă efectuarea antibiogramei pe mediu Müller Hinton cu 5% sânge de berbec. Testarea difuzimetrică nu este adecvată pentru penicilină sau ampicilină, iar în cazul în care streptococii viridans provin din cavităţi sterile ale organismului, aceste antibiotice trebuie testate prin metode cantitative care să permită stabilirea valorii CMI. În cazul în care valorile CMI indică o tulpină cu sensibilitate intermediară, în terapie trebuie asociat un aminoglicozid, pentru a asigura efectul bactericid.

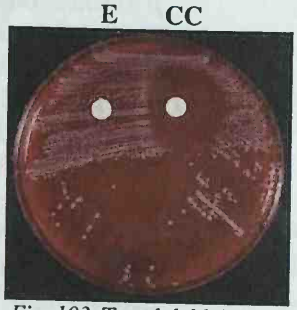


Fig. 103. Testul dublei difuzii care evidenţiază rezistenţa inductibilă la clindamicină în prezenţa eritromicinei.

În ceea ce priveşte *Str. pneumoniae,* mecanismele rezistenţei la peniciline constau în alterarea PBPs, care determină reducerea afinităţii pentru această clasă de antibiotice. Rezistenţa poate fi de nivel scăzut, convenţional numită „intermediară"(I), sau de nivel înalt, numită rezistenţa

clinică totală (R). În meningitele pneumococice se utilizează cu succes doze mari de peniciline (până la 24 de milioane de doze pe zi în cazul tulpinilor cu CMI de 4 μg/ml) sau alte antibiotice β-lactamine (cefotaxim, ceftriaxonă, meropenem), însă numai după determinarea valorii CMI (CLSI, 2010). Izolatele din LCR trebuie obligatoriu testate şi pentru sensibilitate la vancomicină, prin metode cantitative care permit stabilirea CMI (CLSI, 2010). Pentru izolatele non-LCR se pot administra amoxicilină, amoxicilină cu acid clavulanic, cefalosporine de generația a III-a şi a IV-a şi tetracicline.

Macrolidele, lincosamidele şi streptograminele (MLS) sunt antibiotice care acționează asupra mecanismelor sintezei proteinelor inhibând inițierea legării ARNm la nivelul ribosomilor. Sunt cunoscute două mecanisme prin care se produce apariția rezistenței la aceste antibiotice: unul numit MLSB, rezultat prin dobândirea genei specifice de rezistență *erm* (*erythromycin ribosomal methylation gene*), prin modificarea țintei, iar celălalt prin dobândirea genelor pentru sistemul de eflux (*mef*E). Antibiograma se realizează pe mediu Müller Hinton cu 5% sânge de berbec utilizând oxacilina pentru interpretarea sensibilității la penicilină.

Pentru enterococi, testarea sensibilității la antibiotice se realizează pe mediu Müller Hinton. Dintre antibioticele β-lactamice, se testează penicilina sau ampicilina, sensibilitatea la penicilină fiind extrapolată pentru sensibilitatea la ampicilină, amoxicilină, piperacilină, amoxicilină cu acid clavulanic, piperacilină tazobactam, ampicilină sulbactam si imipenem. Rezistența la penicilină sau ampicilină poate fi datorată în cazuri foarte rare producerii β-lactamazei, care se evidențiază prin testul rapid al hidrolizei nitrocefinului, deoarece enzima fiind produsă în cantitățăți mici nu poate fi detectată prin metoda difuzimetrică. De asemenea, enterococii pot apărea sensibili *in vitro* la trimetoprim-sufametoxazol (biseptol), însă *in vivo* devin rezistenți la acest antibiotic, deoarece pot utiliza folați exogeni disponibili în organismul gazdă pentru sinteza bazelor azotate, a căror producere este inhibată de acest antibiotic.

Bibliografie selectivă

1. Allen S. H., Brennan-Benson P, Nelson M., Asboe D., Bower M., Azadian B., Gazzard B., Stebbing J. 2003. Pneumonia due to antibiotic resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in the HAART era Postgrad Med J; 79:691–694
2. AlonsoDeVelasco, E., Verheul, A. F. M., Verhoef, J., Snippe, H. 1995. *Streptococcus pneumoniae: Virulence Factors, Pathogenesis, and Vaccines.* Microbiological Reviews. 59: 591–603.
3. Arthur M, Courvalin P.1993. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. Antimicrob Agents Chemother; 37:1563
4. Artz, A. S., Ershler, W. B., Longo, D. L. 2003. *Pneumococcal Vaccination and Revaccination of Older Adults.* Clinical Microbiology Reviews. 16: 308-318.
5. Buiuc D., Neguț, M. 2008. Tratat de Microbiologie medicală, ed. a II-a, Ed. medicală, Bucureşti
6. http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/photo2detail.php?id=221
7. http://www.scielo.org.ar/img/revistas/ram/v38n3/3a13f1.jpg
8. http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=16
9. Clinical Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptiblity test. M2A10, vol. 29, no. 1
10. Jawetz, Melnick şi Adelberg. 2007. 24th Edition of Medical Microbiology, McGraw-Hill Companies, http://www.accessmedicine.com
11. Jedrzejas, M. J. 2001. *Pneumococcal Virulence Factors: Structure and Function.* Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65: 187–207.
12. Jett, B. D., Huycke M. M., Gilmore, M. S. 1994. Virulence of enterococci . Clin. Microbiol. Reviews. 7 (4): 462–478.
13. Kayaoglu, G., Ørstavik D. 2004. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. Crit Rev Oral Biol Med. 15(5):308–320
14. Murray, Barbara E. 1990. The Life and Times of the *Enterococcus* . Clin. Microbiol. Reviews. 3 (1):46-65.
15. Murray, Barbara E. 1998. Diversity among Multidrug-Resistant Enterococci. Emerging Infectious Diseases. 4: 1.
16. Österlund, A., Engstrand, L. 1997. An intracellular sanctuary for *Streptococcus pyogenes* in human tonsillar epithelium – studies of asymptomatic carriers and in vitro cultured biopsies. *Acta Otolaryngol* 117, 883–888
17. Silva-Costa, C., Ramirez, M., Melo-Cristino, J. 2006. Identification of macrolide-resistant clones of *Streptococcus pyogenes* in Portugal Clinical Microbiology & Infection, 12 (6): 513–518
18. Stoolmiller, A.C., Dorfman, A. 1969. The biosynthesis of hyaluronic acid by *Streptococcus.* J. Biol. Chem., 244, 236–346
19. Swedo SE, Leonard HL, Mittleman BB, et al. 1997. Identification of children with pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcal infections by a marker associated with rheumatic fever. Am J Psychiatry; 154:110–112
20. Todar, K. 2008.Todar's Online Textbook of Bacteriology – www.textbookofbacteriology.net
21. WHO. 2003. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology, 2nd Edition WW.

6.3. Coci piogeni Gram negativi de importanţă medicală – Familia Neisseriaceae

6.3.1. Genul *Neisseria*

Familia *Neisseriaceae* cuprinde coci Gram negativi, strict aerobi, care aparţin următoarelor genuri: *Neisseria, Kingella, Eikenella, Simonsiella* şi *Alysella.*

Tabelul 13.

Caracterele biochimice ale speciilor genului *Neisseria* şi *Moraxella catarrhalis* (după Brooks şi colab., 2007).

		Fermentarea glucidelor				
	Creştere pe mediu Thayer-Martin modificat (cu vancomicină, colistin, amfotericină), mediu Martin-Lewis sau New York City	Glucoza	Maltoza	Lactoza	Zaharoza sau fructoza	DN-aza
N. gonorrhoeae	+	+	+	–	–	+
N. meningitidis	+	+	+	–	–	+
N. lactamica	+	+	+	+	–	–
N. sicca	–	+	+	–	+	–
N. subflava	–	+	+	–	±	–
N. mucosa	–	+	+	–	+	–
N. flavescens	–	–	–	–	–	–
N. cinerea	±	–	–	–	–	–
N. polysaccharea	±	+	+	–	–	–
N. elongata	–	–/w	–	–	–	–
M. catarrhalis	–	–	–	–	–	+

* Celulele colorate diferit corespund testelor utilizate pentru diferenţierea speciilor de *Neisseria* de importanţă clinică.

Genul *Neisseria* cuprinde mai multe specii comensale pe mucoasa tractului respirator superior (tabelul 13), dintre care numai două specii sunt patogene, şi anume:

– *N. gonorhoeae* (gonococ) (agentul gonococozei, blenoragiei sau gonoreei, cu complicaţii grave la femei), cu o prevalenţă mare in populaţie, dar care rareori produce infecţii letale;

– *N. meningitidis* (meningococ) (agentul meningitei cerebrospinale), cu o prevalenţă scăzută, dar infecţiile netratate sunt adeseori letale.

Cele două specii au omologie la nivel de ADN de 70–80%, dar produc entităţi clinice distincte.

Celulele de *Neisseria* sunt grupate în perechi (diplococi sub formă de boabe de cafea) (fig. 104).

Fig 104. Imagine de microscopie electronică de scanning care evidenţiază diplococi de *Neisseria gonorrhoeae* (student.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab16/dkngon.html)

Fig. 105. Aspectul culturii de *N. meningitidis* pe geloză sânge (www.visualphotos.com/image/2x4140933/meningitis_bacteria_neisseria_meningitidis).

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITARY

Coloniile (1–5 mm) sunt transparente sau opace, convexe, mucoide, nepigmentate şi nehemolitice (fig. 105). *N. flavescens, N. subflava* şi *N. lactamica* produc un pigment galben. *N. sicca* formează colonii opace, fine, rugoase. *Moraxella catarrhalis* poate forma colonii opace nepigmentate sau roz-gri.

Neisseria creşte în condiţii aerobe, deşi unele specii cresc şi în anaerobioză. Cele mai multe specii metabolizează glucidele pe cale oxidativă cu acidifierea mediului, fără producere de gaz. Unul dintre principalele teste biochimice utile pentru identificarea acestora este reacţia oxidazei (în prezenţa tetrametil-parafenilenediaminei hidrochlorice), totdeauna pozitivă. Neisseriile necesită medii bogate de cultivare, cu adaos de sânge tratat termic, hemină, proteine animale şi incubare în atmosferă de CO_2 (5%).

Factorii de virulenţă ai speciilor patogene de *Neisseria* sunt reprezentaţi de:

- pili, prin intermediul cărora *Neisseria* aderă la celulele epiteliale neciliate (fig. 106);
- LPS;
- capsula cu efect antifagocitar, la *N. meningitidis;*
- secreţia proteazelor care clivează IgA.

Antigenele membranei externe la *N. gonorhoeae* şi *N. meningitidis* sunt reprezentate de proteine cu funcţie de porine, LPS şi lipoproteine. Prin fenomenul variaţiei de fază* a antigenelor suprafeţei celulare (pilina, LPS, proteinele membranei externe) se produce comutarea între fenotipuri.

* Variaţia de *fază* înseamnă că o structură dată este sau nu este produsă. Variaţia *antigenică* semnifică faptul că aceeaşi structură se produce în variante biochimice diferite.

LPS este o moleculă incompletă, deoarece îi lipseşte regiunea polizaharidică externă, motiv pentru care este numită lipooligozaharid (LOS), fiind alcătuită din oligozaharidul regiunii intermediare şi lipidul A. Toxicitatea infecţiei gonococice se datorează efectelor endotoxice ale LOS.

Factorul major al virulenţei la *N. meningitidis* şi *N. gonorrhoeae* este variaţia antigenică a apendicelor celulare, denumite fimbrii. La *Neisseria*, pentru aceste structuri s-a păstrat denumirea de *pili* (fig. 107). Pilii sunt cele mai importante adezine de natură proteică, prin intermediul cărora celulele bacteriene aderă la suportul celular eucariot: celule epiteliale, endoteliale, fagocite.

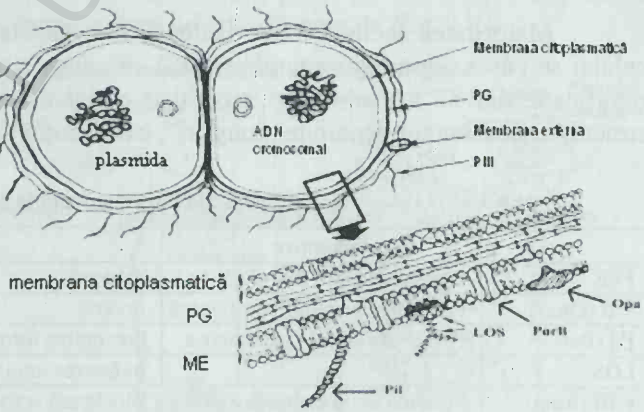


Fig. 106. Structura schematică a celulelor de *N. gonorrhoeae* (peretele celular, cromosomul bacterian, plasmidele criptice şi structurile de membrană externă – pili, LOS, porine (PorB) şi proteine de aderenţă Opa) (Unemo şi colab., 2004).

Fig. 107. Imagine electrono-optică, prin tehnica coloraţiei negative, a celulelor de *Neisseria*, cu dispoziţia pericelulară a fimbriilor (textbookofbacteriology.net/.../N.gonorrhoeae.jpg.).

In vitro, N. meningitidis şi *N. gonorrhoeae* aderă la celulele epiteliale ale tractului urinar uman şi ale unui număr limitat de specii animale. Omul este singurul rezervor natural de infecţie pentru aceste bacterii. Alte adezine cu rol în virulenţă sunt proteinele membranei externe.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Traversarea epiteliului. După atașarea de polul apical al celulelor epiteliale, cocii sunt internalizați prin mecanismul endocitozei mediate de receptori (fig. 108). Este posibilă multiplicarea intracelulară, după care cocii traversează citoplasma și se eliberează prin exocitoză în spațiul subepitelial (fig. 109).

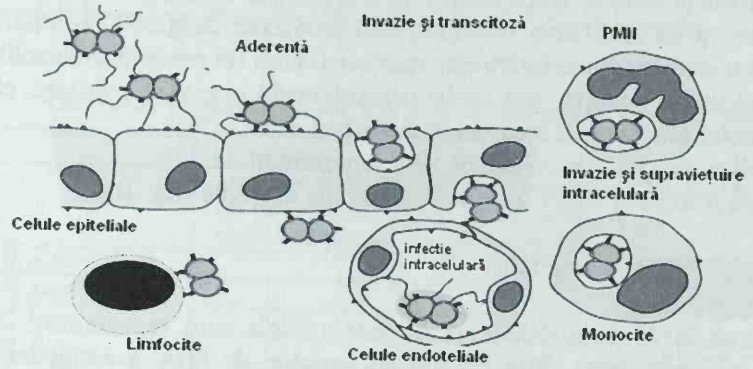


Fig. 108. Mecanismul producerii infecțiilor diseminate de către neisserii: aderența la celulele epiteliale, mediată de proteine *opa* (proteine ale membranei cu rol în procesul de aderență), este urmată de traversarea epiteliului și pătrunderea în torentul sanguin (după Schneider și colab., 2006).

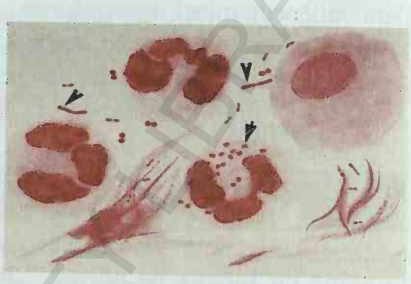


Fig. 109. N. gonorrheae. Săgețile indică forme pleomorfe, pseudobacilare și diplococi intracelulari (Nowicki et al., 1999)

6.3.1.1. *N. gonorrhoeae* * nu este niciodată constituent al microbiotei normale. Este un coc Gram negativ, frecvent intracelular in PMN (fig. 95), cu diametrul cuprins între 0,60–1,0 μm, sensibil la variații de temperatură, uscăciune, UV. Se cultivă pe medii care conțin hemoglobină, NAD, extract de levuri, la 35–36°C, în atmosferă de 3–10% CO_2.

*Neisser (1879) a identificat *N. gonorrhoeae* în exsudatul pustular numit "Gonorrhoea" (galen – scurgere). Paracelsus (1530) considera că gonoreea este un simptom al sifilisului.

Majoritatea factorilor de virulență sunt asociați cu peretele celular (tabelul 14). În peretele celular se găsesc lipooligozaharide (LOS), omologe structural cu LPS, pentru că au o structură bazală ramificată, dar nu au subunități repetitive antigenice de tip O. În timpul creșterii, bacteria elimină structuri membranare denumite „muguri", care conțin LOS.

Tabelul 14.

Factorii de virulență la *N. gonorrhoeae*.

	Denumire	*Rol*
PilE	Proteina majoră fimbrială	Aderență
P.II (Opa)	Proteină din membrana externă	Invazie
P.I (Por)	Porină din membrana externă	Prevenirea formării de fagolizosomi și/sau inhibarea cascadei oxidative
LOS		Inducerea unui răspuns inflamator prin eliberarea TNF
P.III (Rmp)	Proteină din membrana externă	Blochează activitatea bactericidă a anticorpilor anti- P.I și LOS
Tbp1 and Tbp2	Receptori de transferină	Preluarea Fe
Lbp	Receptori de lactoferină	Preluarea Fe

LOS este un factor major de virulență deoarece:

- stimulează producerea de TNF și recrutează neutrofilele la locul infecției;
- conferă rezistență la acțiunea bactericidă a serului, prin faptul că *N. gonorrhoeae* poate utiliza acidul N-acetil neuraminic pentru a-și sializa propriul LOS generând apariția unei microcapsule;
- prezintă omologie cu antigenele de grup sangvin, ceea ce induce imunotoleranța gazdei.

N. gonorrhoeae poate prelua Fe din transferina umană (prin intermediul a 2 receptori de transferină (*Tbp1* și *Tbp2* și din lactoferina umană (receptor de lactoferină – *Lbp*).

Cele două proteaze clivează IgA_1 din secreția mucoasei, iar regiunile Fab ale anticorpilor clivați se fixează pe suprafața celulei bacteriene blocând funcțiile biologice ale Ig mediate de Fc.

Antigenele de suprafață ale *N. gonnorhoeae* (pilina, LPS, Opa – proteină a membranei externe cu rol de adezină) suferă *variație antigenică de fază.* Variația antigenică periodică favorizează evaziunea față de apărarea gazdei, ceea ce facilitează infecția repetată. Variantele antigenice ale pilinei, Opa și LOS apar cu o frecvență de $1/10^3$, extrem de rapidă pentru populațiile bacteriene. Gonococii pot să inactiveze total sau parțial gena codificatoare a pilinei și să o înlocuiască cu o altă genă sau cu o parte a altei gene.

Un alt mecanism al evaziunii sistemului imunitar este *mimetismul molecular*: prezența pe suprafața gonococilor și a celulelor epiteliale ale uretrei, a unor molecule asemănătoare din punct de vedere antigenic. De exemplu, *in vivo*, gonococii exprimă molecule particulare de LOS esterificate cu acid sialic, asemănătoare glicosfingolipidelor* membranare ale celulelor epiteliale și nu sunt recunoscute de sistemul imunitar al gazdei. Aceste celule sunt rezistente la factorii serici (anticorpi, complement, proteine litice), dar incapabile să depășească suprafața mucoasei.

* Galactoza terminală a glicosfingolipidelor membranare este adeseori conjugată cu acidul sialic (9 atomi de C). Gonococii nu sintetizează acidul sialic, dar sintetizează sialil-transferaza, ce catalizează sializarea galactozei terminale a LOS gonococic.

Variația antigenică poate să genereze molecule de LPS nesializate. Tulpinile bacteriene cu LPS nesializate sunt aderente și invazive pentru celulele epiteliale ale mucoasei. Explicația este că LPS sializate sunt asemănătoare moleculelor de suprafață ale celulelor eucariote și sunt tolerate de efectorii imunitari. Astfel, celulele bacteriene cu LPS sializate pot supraviețui în mediul extracelular pentru că nu sunt recunoscute de sistemul imunitar, iar cele cu LPS nesializate sunt invazive, pătrund în celulele epiteliale și scapă acțiunii efectorilor imunitari.

Gonococii conțin câteva plasmide, dintre care unele codifică sinteza β-lactamazei și conferă rezistență la peniciline. Plasmidele se transmit prin conjugare.

N. gonnorhoeae este o cauză majoră a infecțiilor cu transmitere sexuală. Produce în special infecția tractului urogenital – *infecția gonococică simplă*, cu colonizarea mucoasei uretrale la bărbat (uretrite) și a endocervixului și uretrei la femeie (uretrite, cervicite). *N. gonorhoeae* reprezintă a doua cauză majoră a uretritei după *Chlamydia trachomatis*. La ambele sexe poate produce forme de infecție ano-rectală sau faringiană, conjunctivite, gonococemie și/sau infecții diseminate (fig. 110).

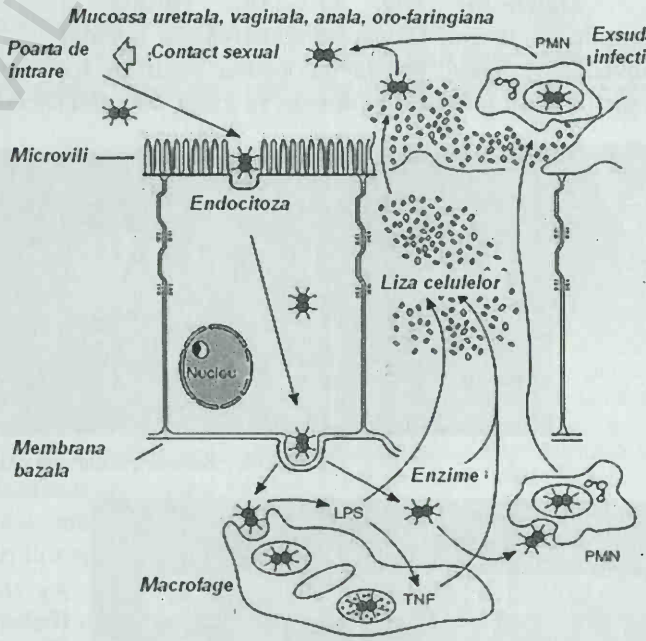


Fig. 110. Ilustrarea schematică a mecanismului patogenezei *N. gonorrhoeae*: aderența la epiteliul neciliat columnar și la microvili, mediată de fimbrii (pili de tip 4-N-metilfenilalanina) și de proteine *opa (proteine ale membranei cu rol în procesul de aderență)* (după Schneider și colab., 2006).

Din punct de vedere clinic, gonoreea se prezintă ca o infecție supurativă la nivelul uretrei, cervixului, rectului, faringelui și conjunctivei, simptomatică în special la bărbați (indurație, edem, hipertermie, durere locală, senzație de arsură, în special după micțiune). La femei, 50% din cazuri sunt asimptomatice, iar endocervicita se manifestă prin scurgere vaginală și uneori, disurie.

Fig. 111. Leziuni cutanate la un pacient cu diseminare sistemică a *N. gonorrhoeae* (www.lib.uiowa.edu/hardin/MD/cdc/gonorrhea2.html).

Infecția poate evolua ascendent, prin continuitate producând la bărbați prostatite, orhite, proctite, epididimite iar la femei, salpingite, ovarite, ultimele rezultate prin autoinoculare din scurgerea cervicală, artrite, dermatite, endocardite, meningite. La femei, boala inflamatorie pelvică poate fi urmată în 15% din cazuri de instalarea sterilității. Rareori, infecția gonococică este diseminată sub forma unei septicemii, a erupției eritematoase (*rash*) sau a artritei (fig. 111).

O astfel de infecție diseminată este produsă de tulpinile cu sensibilitate înaltă la penicilină, iar pentru creștere necesită aportul exogen de arginină, hipoxantină și uracil (Ison și Robertson, 1999).

La nou-născuți poate produce infecții oftalmice grave *(ophthalmia neonatorum)* (cu orbire prin desprinderea sau perforarea corneei), ce pot fi prevenite prin instilarea conjunctivală a soluției de $AgNO_3$ sau a antibioticelor imediat după naștere.

Gonococii izolați din probele clinice sunt piliați. Prin cultivare pe medii neselective, formează colonii mai mari, iar celulele își pierd pilii.

Diagnostic (fig. 112–114). Puroiul și secrețiile din uretră, cervix, conjunctivă sau lichidul sinovial se folosesc pentru inocularea mediilor speciale în scopul izolării și pentru analiza microscopică a frotiului colorat Giemsa. În cazul infecției sistemice, *Neisseria* se cultivă din proba de sânge.

Fig. 112. Dezvoltarea coloniilor pe geloză-chocolat la 24 și respectiv 48 de ore. Se observă că tulpinile producătoare de β-lactamază formează colonii mai mari la 24 de ore, comparativ cu tulpinile sensibile.

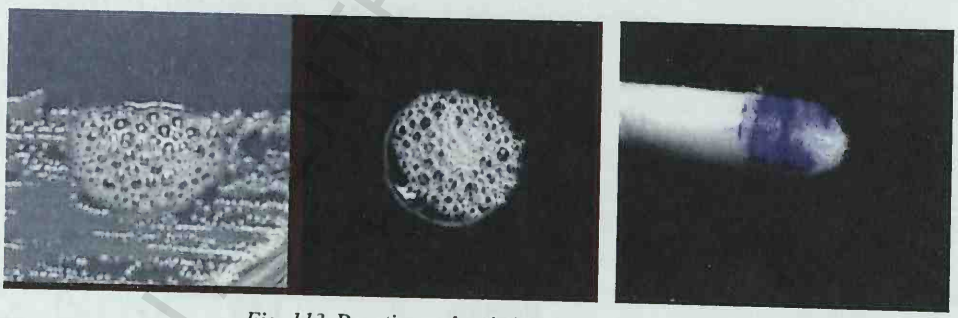


Fig. 113. Reacția catalazei și oxidazei (pozitive).

Fig. 114. Profilul biochimic al speciei *N. gonorrhoeae* (C-control, G-glucoza, M- maltoza, L-lactoza, S-zaharoza/sucroza) Diagnosticul de laborator al infecțiilor cu *N.gonnorhoeae* (http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/tests/acid.html).

În serul pacienților cu infecție gonococică crește titrul anticorpilor serici specifici, iar în secreția mucoasă crește cantitatea de sIgA. Totuși, după infecție *imunitatea nu este protectoare* și de

aceea infecțiile multiple sunt frecvente. Absența imunității protectoare se datorează atât heterogenității antigenice a agentului infecțios, cât și timpului de înjumătățire foarte scurt al anticorpilor din secreția mucoasă, deoarece anticorpii serici au efect protector minim al mucoaselor.

Nu există un *vaccin* protector față de infecția gonococică, datorită variației biochimice a antigenelor pe care trebuie să le conțină preparatul vaccinal. Vaccinurile polizaharidice nu stimulează un răspuns imun protector, datorită imunogenității scăzute sau datorită asemănării cu resturile de acid sialic ale țesutului uman.

N. gonnorhoeae se transmite exclusiv prin contact sexual, de la bărbați și femei asimptomatici. După un singur contact sexual cu un partener infectat, riscul infecției este de 20–30%.

Tratamentul de elecție este reprezentat de cefalosporine de generația a III-a sau fluorochinolone asociate cu doxiciclina sau eritromicina, această schemă fiind eficientă și în cazurile de infecție cu *Chl. trachomatis.*

CLSI recomandă realizarea antibiogramei pe mediu GC (care conține cisteină, guanină, tiamină, APAB, cocarboxilază, NAD, adenină, glutamină, glucoză, nitrat feric). În general gonococii sunt sensibili la antibioticele recomandate de CLSI, singurele antibiotice pentru care s-a raportat sensibilitate diminuată *in vitro* fiind cefmetazol, cefotetan, cefoxitin și spectinomicina (CLSI, 2009).

6.3.1.2. *N. meningitidis* este saprobiontă pe mucoasa tractului respirator superior uman (omul este singura gazdă naturală pentru aceste microorganisme patogene). Meningococii saprobionți sunt totdeauna necapsulați, dar au apendice piliare, iar cei invazivi sunt *capsulați* și *piliați*. Tulpinile *capsulate* pot să producă meningita (inflamația meningelui la nivelul creierului și măduvei osoase) cu mortalitate de 50% la copiii de 6–1 luni.

Transmiterea se face pe cale aeriană, iar evoluția este endemică în Europa, unde numărul de cazuri crește în timpul iernii, cele mai frecvente fiind serogrupurile B și C și epidemică în Africa, centura de meningită fiind situată între cele două tropice, iar serogrupul A este cel mai frecvent.

Pe baza variației compoziției *polizaharidului capsular*, tulpinile capsulate de *N. meningitidis* au fost împărțite în *13 serogrupuri*. Unele serogrupuri (serogrupul B) au omologie față de un polizaharid al neuronilor SNC. Serogrupurile A, C, Y și W 135 intră în componența vaccinului față de meningita bacteriană.

La pacienții cu infecție activă, antigenele de meningococ se găsesc în sânge și în LCR.

Celulele bacteriene se fixează pe celulele epiteliale ale nazofaringelui prin intermediul pililor care proemină la suprafața polizaharidului. Pierderea capacității asamblării pililor împiedică aderența meningococilor capsulați la celulele epiteliale.

Tulpinile patogene depășesc bariera epitelială și trec în sânge, producând bacteriemie. La copiii nou-născuți și adolescenți, bacteria poate disemina în sânge determinând septicemii, cu forma *cea mai gravă de purpura fulminans*, sau sindrom infecțios sever, însoțit de leziuni necrotice și meningită (fig. 115).

Fig. 115. Fetiță de 4 luni cu gangrenă a degetelor de la mână cauzată de meningococemie (www.cdc.gov/meningitis/about/photos.html., 1965).

Cea mai comună complicație a bacteriemiei este *meningita*, cu manifestări clinice care debutează brusc (dureri de cap, vomă și comă în câteva ore).

O infecție asimptomatică a nazofaringelui evoluează în bacteriemie și meningită, probabil, ca rezultat al activării unei gene sau dobândirii prin conjugare a unei gene codificatoare a unui factor de virulență. Anticorpii specifici față de varianta antigenică capsulară sau piliară sunt protectori. În prezența anticorpilor specifici, cu funcție opsonizantă, meningococii sunt fagocitați.

Diagnosticul de laborator. N. meningitidis este un microorganism foarte sensibil la rece și la desicare, se dezvoltă la 37°C în prezența CO_2 după 48 de ore, pe medii bogate (fig. 116–117). Proba de sânge sau de LCR este folosită ca inocul pentru cultivarea *N. meningitidis*, dar și pentru examinarea frotiului colorat Giemsa. Tamponul nazofaringian servește pentru determinarea stării de purtător. Anticorpii anti-polizaharid capsular se determină prin reacții de aglutinare pasivă a particulelor de latex sau a hematiilor.

Fig. 116. Dezvoltarea coloniilor pe geloză-chocolat cu factori de creştere la 24 şi respectiv 48 de ore.

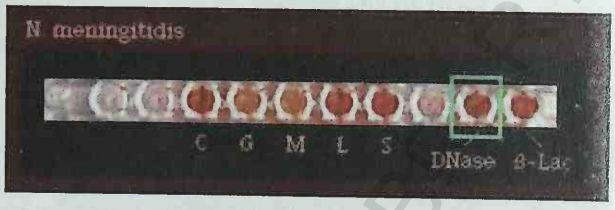


Fig. 117. Profilul biochimic al speciei *N. menigitidis* (C-control, G-glucoza, M- maltoza, L-lactoza, S-zaharoza/sucroza) Diagnosticul de laborator al infecţiilor cu *N.meningitidis* (http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/tests/acid.html).

Epidemiile de meningită meningococică apar în aglomerări umane (tabere militare, pelerinaje). În perioadele interepidemice, proporţia purtătorilor de meningococi în nazofaringe nu depăşeşte 30%, iar în timpul epidemiilor, proporţia purtătorilor atinge 80%. Numărul cazurilor de meningită clinică este proporţional cu numărul purtătorilor.

Testarea sensibilităţii la antibiotice prin metoda difuzimetrică se realizează pe mediu Müller Hinton cu adaos de 5% sânge de berbec. Tratamentul de elecţie este reprezentat de β-lactamice (în special cefalosporine de generaţia a treia sau cloramfenicol la persoanele alergice). *N. meningitidis* are sensibilitate redusă la peniciline (care, conform recomandărilor CLSI nu se testează difuzimetric), iar în plus, penicilinele nu traversează bariera hematoencefalică indemnă. Pentru chimioprofilaxia indivizilor din anturajul direct al bolnavului se utilizează rifampicina, aztitromicina, tetraciclinele, fluorochinolonele, biseptolul (CLSI, 2009). Pacienţii cu meningită sunt o sursă neglijabilă de infecţie. Infecţia repetată cu *N. meningitidis* este rară, deoarece imunitatea specifică este protectoare şi variaţia antigenică a polizaharidului capsular este foarte limitată.

6.3.1.3. Alte specii de Neisseria

N. lactamica, specie rezidentă a mucoasei nazo-faringiene la 3–40% dintre indivizi, în special copii, este rareori implicată în etiologia proceselor infecţioase, însă cunoaşterea caracterelor de laborator este importantă deoarece creşte pe mediile selective utilizate pentru cultivarea neisseriilor patogene (mediul Thayer-Martin modificat). Spre deosebire de celelalte specii de *Neisseria, N. lactamica* fermentează lactoza (tabelul 12, fig. 118).

Fig. 118. Aspectul coloniilor şi profilul biochimic al speciei *N. lactamica* (C-control, G-glucoza, M-maltoza, L-lactoza, S-zaharoza/sucroza) (http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/tests/acid.html).

N. sicca, N. subflava, N. cinerea, N. mucosa şi *N. flavescens* colonizează nazo-faringele, fiind doar rareori implicate în etiologia proceselor infecţioase.

N. cinerea se aseamănă morfologic şi biochimic (reacţia hidroxiprolil-aminopeptidază pozitivă) cu *N. gonorrhoeae,* dar este sensibilă la colistin (fig. 119, 120).

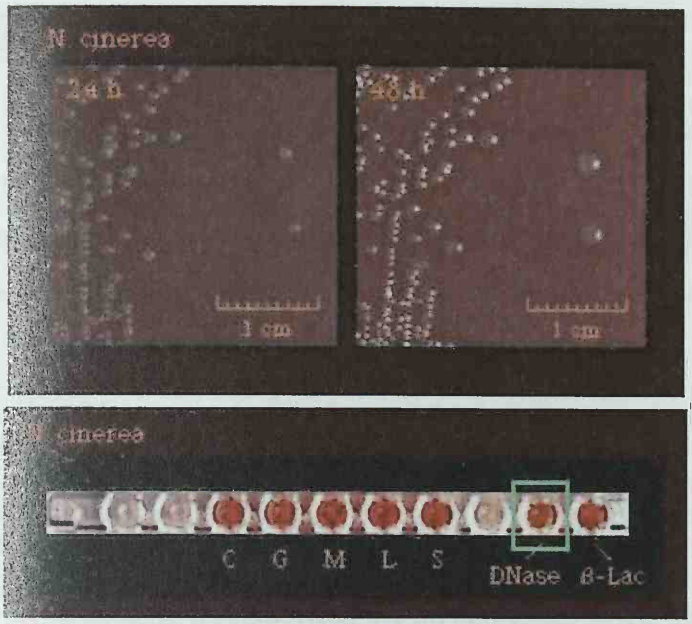


Fig. 119. Aspectul coloniilor şi profilul biochimic al speciei *N. cinerea* (C-control, G-glucoza, M- maltoza, L-lactoza, S-zaharoza/sucroza) (http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/tests/acid.html).

Fig. 120. Sensibilitate la colistin, spre deosebire de *N. gonorrhoeae, N. meningitidis* şi *N. lactamica*, care sunt rezistente

6.3.2. *Moraxella catarrhalis* (anterior *Branhamella / Neisseria catarrhalis*) face parte din microbiota normală a tractului respirator superior la 40–50% dintre copiii şcolari, la care poate produce bronşite, pneumonii, sinuzite, otite medii şi conjunctivite, ca şi infecţii la pacienţii imunodeprimaţi. Majoritatea tulpinilor de *M. catarrhalis* izolate din contexte clinice relevante sunt producătoare de β-lactamază. *M catarrhalis* se poate diferenţia de celelalte neisserii prin absenţa fermentării zaharurilor şi prin producerea DN-azei (fig. 121). De asemenea, produce butirat-esterază, caracter care stă la baza unui test rapid, fluorimetric de identificare.

6.3.3. *Kingella denitrificans* (diplococi/icocobacili/bacili Gram negativi) poate fi izolată pe mediile folosite pentru cultivarea *N. gonorrhoeae,* profilul biochimic fiind de asemenea similar (fig. 122), iar la nivel serologic pot apărea reacţii încrucişate între cele două specii.

Coloniile de *K. denitrificans* sunt mai mici, netede. Criteriul de diferenţiere este reprezentat de reacţia negativă pentru catalază şi reacţia pozitivă pentru reducerea nitraţilor.

Fig. 121. Profilul biochimic al speciei *B. catarrhalis* (C-control, G-glucoza, M-maltoza, L-lactoza, S-zaharoza/sucroza) (http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/tests/acid.html)

Fig. 122. Profilul biochimic al speciei *Kingella denitrificans* (C-control, G-glucoza, M- maltoza, L-lactoza, S-zaharoza/sucroza) (http://www.cdc.gov/std/gonorrhea/lab/tests/acid.html).

Bibliografie selectivă

Ison C., Robertson B. 1999. *Neisseria. Infection and Immunity.* EI, Acad. Press, Ed. P. Delves, I. Roitt.

Nowicki S, Selvarangan R, Anderson G. 1999. Experimental transmission of *Neisseria gonorrhoeae* from pregnant rat to fetus.Infect Immun. 67(9):4974–6.

www.student.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab16/dkngon.htm

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Muriel C. Schneider, Rachel M. Exley, Hannah Chan, Ian Feavers, Yu-Hoi Kang, Robert B. Sim and Christoph M. Tang. 2006. Functional Significance of Factor H Binding to *Neisseria meningitidis*. The Journal of Immunology. 176: 7566–7575.

www. textbookofbacteriology.net/.../N.gonorrhoeae.jpg

www.visualphotos.com/image/2x4140933/meningitis_bacteria_neisseria_meningitidis

www.cdc.gov/meningitis/about/photos.html

Unemo, M., Olcen, P., Jonasson, J., Fredlund, H. 2004. Molecular Typing of Neisseria gonorrhoeae Isolates by Pyrosequencing of Highly Polymorphic Segments of the porB Gene. J. Clin. Microbiol. 42: 2926–2934.

Brooks G. F., Caroll K. C., Butel J. S., Morse S. A. eds. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition http:// www.accessmedicine.com

Clinical Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptiblity test. M2A10, vol. 29, no. 1.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7. BACILI GRAM NEGATIVI DE IMPORTANŢĂ MEDICALĂ

7.1. Familia Enterobacteriaceae

Din această familie fac parte bacterii Gram negative, larg răspândite în natură (în sol, în ape, pe plante, în tractul intestinal al omului şi al animalelor). Morfologia tipică pe mediul solidificat este cea de bacili mobili cu flageli peritrihi sau imobili, dar în probele clinice este mult mai variată. Unele specii sunt capsulate (*Klebsiella* sp.), dar majoritatea sunt necapsulate. Familia include aproximativ 30 de genuri şi 110 specii, majoritatea comensale, dar şi specii patogene (produc diaree, gastroenterite, enterite, dizenterie, adenite mezenterice, febra septicemică).

Speciile sunt grupate în triburi, dintre care 20–25 specii sunt importante din punct de vedere clinic:

- *E. coli* produce infecţii ale tractului intestinal, urinar, meningita neonatală;
- *Sh. dysenteriae,* agentul dizenteriei bacilare;
- *S. enteritidis* produce toxiinfecţii alimentare, gastroenterite;
- *S. typhi* produce febra tifoidă;
- *Proteus sp.,* saprobiont pe materia organică în descompunere;
- *Yersinia pestis*, agentul ciumei bubonice;
- *Klebsiella* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp.;
- *Erwinia,* o bacterie fitopatogenă etc.

Sunt bacili Gram negativi nesporulaţi (pe frotiu, diferitele enterobacterii nu se disting morfologic), fără exigenţe nutritive, aerobi, facultativ anaerobi, fermentează numeroase glucide, adeseori cu formare de gaze, sunt pozitive pentru catalază (cu excepţia *Sh. dysenteriae*, serotip 1), oxidază-negative, reduc NO_3 la NO_2. Fermentează glucoza, cu sau fără producere de gaz, proprietate metabolică importantă pentru diferenţierea de alte bacterii (bacili Gram negativi glucozo-fermentativi).

Unele specii sunt componente ale microbiotei normale a omului şi animalelor şi rareori produc manifestări clinice, altele sunt totdeauna patogene (*Salmonella sp., Shigella sp.*).

Enterobacteriaceele au o structură antigenică complexă (fig. 123) şi produc o mare varietate de toxine. La *E. coli* s-au identificat peste 150 de variante ale antigenului O termostabil (LPS), peste 100 de variante ale antigenului termolabil K (polizaharid capsular) şi peste 50 de variante ale antigenului H (flagelar).

Antigenul O, reprezentat de polizaharidul regiunii externe a LPS, este alcătuit din secvenţe glucidice repetitive, este termo- şi alcoolo-rezistent şi se evidenţiază prin reacţia de aglutinare. Antigenul O se păstrează sub forma suspensiei celulare alcoolate.

Fiecare gen de enterobacterii are un antigen O cu specificitate de grup, dar un singur organism poate avea câteva antigene O. Uneori genuri diferite de enterobacterii (*Shigella sp.* şi *E. coli*) au antigene O comune. Serul imun anti-O de *E. coli* reacţionează încrucişat şi aglutinează celulele de *Providencia sp., Klebsiella sp., Salmonella sp.*.

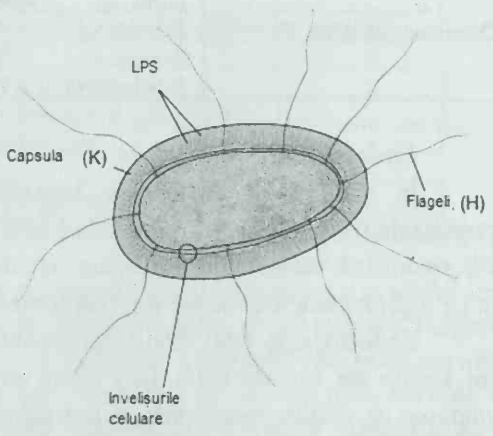


Fig. 123. Structurile antigenice parietale prezente la enterobacterii (după Brooks şi colab., 2007).

Antigenul K este localizat la suprafața celulei, extern în raport cu antigenul O. La unele genuri (*Klebsiella sp., Escherichia sp.*), antigenul K este de natură *polizaharidică*, iar la altele este de natură *proteică*. Prezența antigenului K maschează antigenul O și inhibă aglutinarea bacteriană cu anticorpi specifici anti-O.

Antigenul H este reprezentat de proteina flagelară, denaturată de căldură și de alcool. Se conservă sub forma suspensiei celulare în formol. Determinanții antigenici H sunt reprezentați de secvențe de aminoacizi ai flagelinei, proteina structurală a flagelilor.

Dintre numeroșii agenți patogeni care produc infecții diareice (cauzele principale ale morbidității și mortalității în special în țările subdezvoltate), reprezentanții familiei *Enterobacteriaceae* au cea mai mare frecvență.

În funcție de gradul de patogenitate a tulpinilor de enterobacterii față de organismul gazdă se disting (tabelul 15):

- specii înalt patogene;
- specii patogene;
- specii condiționat patogene, adică nepatogene în condiții obișnuite, dar care pot deveni patogene dobândind determinanți genetici de virulență, sau în anumite condiții, când organismul gazdă are o capacitate de apărare scăzută. De aceea, aceste bacterii sunt considerate condiționat patogene sau oportuniste.

Tabelul 15.

Categorii de patogenitate ale membrilor familiei *Enterobacteriaceae* (după Bernie și colab., 1999, modificat).

Categoria de patogenitate	Gruparea taxonomică	Semnificația etiologică
Înalt patogene	*S. typhi* *Sh. disenteriae* *Y. pestis*	Certă
Patogene	*Salmonella* sp. *Shigella* sp. *Yersinia* sp.	Certă
Condiționat patogene	*Citrobacter* sp. *Enterobacter* sp. *E. coli* (alte localizări decât cea intestinală sau urinară) *Klebsiella* sp. *Proteus* sp. *Morganella* sp. *Providencia* sp. *Serratia* sp.	Semnificativă în prelevatele necontaminate (LCR, numai din cavități închise).
Ocazional patogene	*Cedeceea* sp. *Hafnia* sp. *Kluyvera* sp. *Pantoea* sp. *Tatumella* sp.	

Endotoxine

În membrana externă a bacteriilor Gram negative se găsește complexul molecular lipopolizaharidic (LPS). Termenii de "LPS" și "endotoxină" sunt folosiți cu sensuri echivalente, dar LPS semnifică moleculele purificate, iar denumirea de "endotoxină" desemnează complexul format din LPS și proteinele asociate din membrana externă.

Endotoxinele sunt relativ termo-stabile și mai puțin toxice decât exotoxinele, iar efectele lor sunt lipsite de specificitate. Din punct de vedere chimic, endotoxinele LPS sunt macromolecule complexe ce conțin fosfolipide și polizaharide. Toxicitatea lor rezidă în fracția fosfolipidică. Nu se denaturează și nu rezultă anatoxine.

Endotoxinele LPS reprezintă 25% din moleculele de suprafață ale celulei și sunt esențiale pentru integritatea membranei externe.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7.1.1. Genul *Escherichia*

Fig. 124. Aspectul culturii de *E. coli* pe mediu lactozat (colonii lactozo-pozitive).

Genul *Escherichia* cuprinde microorganisme comensale, componente obişnuite ale microbiotei normale intestinale la om şi animale. În intestinul uman au un rol important în sinteza vitaminelor din grupul B. În anumite condiţii, bacteriile g. *Escherichia* manifestă potenţial de patogenitate. Sunt bacili Gram negativi, mobili sau imobili, care folosesc *acetatul* ca unică sursă de carbon, dar nu folosesc citratul. Unele tulpini sunt anaerobe. Majoritatea tulpinilor fermentează lactoza (fig. 124).

Conţinutul în G+C al ADN variază între 50–51 moli %. *E. coli* are habitatul primar în intestinul organismelor cu sânge cald, împreună cu alte câteva sute de specii bacteriene.

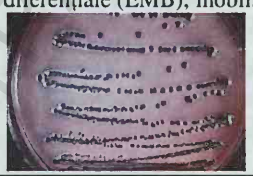
Caractere morfologice şi de cultură. Celulele au formă de bacili drepţi sau uşor curbaţi, cu dimensiuni cuprinse între 1-3 μm lungime. Pot fi mobili datorită flagelilor peritrichi sau imobili. Unele tulpini prezintă fimbrii. Pe baza reacţiei de hemaglutinare directă sau a diferenţelor morfologice, tulpinile de *E. coli* pot fi împărţite în mai multe tipuri fimbriale. *E. coli* se dezvoltă bine pe medii simple de cultură. Pe geloză pot dezvolta colonii „S" convexe, umede, cu suprafaţa lucioasă, margini netede, sau colonii „R" uscate, cu marginile crenelate.

Caractere biochimice şi de metabolism. Sunt microorganisme aerobe şi facultativ anaerobe. Se dezvoltă între limite largi de temperatură şi pH. Creşterea optimă se înregistrează la 37°C şi pH = 7,2 – 7,8.

Capacitatea de a fermenta lactoza permite diferenţierea *E. coli* de alte *Enterobacteriaceae (Salmonella sp., Shigella sp., Proteus* sp. etc.), dar există şi tulpini care fermentează tardiv sau deloc lactoza (tabelul 16). Unele tulpini de *E. coli* sunt capabile să elaboreze substanţe cu acţiune antagonistă (colicine).

Tabelul 16.

Diferenţierea enterobacteriilor în funcţie de capacitatea de a fermenta lactoza şi unele caractere de cultură (după Brooks şi colab., 2007).

Specii care fermentează rapid lactoza
Escherichia coli: luciu metalic pe medii diferenţiale (EMB), mobil, colonii cu profil plat, nevâscoase 
Enterobacter aerogenes: colonii cu profil înalt, fără luciu metalic, adesea mobil, creşterea mai vâscoasă
Klebsiella pneumoniae: imobil, colonii foarte vâscoase, mucoide.
Specii care fermentează tardiv lactoza
Edwardsiella sp., *Serratia* sp., *Citrobacter* sp., *Arizona* sp., *Providencia* sp. , *Erwinia* sp.
Specii care nu fermentează lactoza
Shigella sp.: imobil, nu produce gaz din fermentarea glucozei;
Salmonella sp.: mobil; acid şi adesea produce gaz din fermentarea glucozei;
Proteus sp.: "*swarming*" pe agar; hidrolizează rapid ureea, miros de amoniac.

Rezistenţa la agenţi chimici, fizici şi biologici. Enterobacteriile supravieţuiesc în sol şi apă, luni de zile. Majoritatea tulpinilor sunt omorâte prin expunerea la 60°C timp de 30 minute. Tulpinile de *E. coli* sunt sensibile la acţiunea antisepticelor uzuale: fenol, sublimat, cloramina etc. Sunt sensibile la acţiunea unor coloranţi, cum ar fi verdele brilliant, verdele malachit, clorura de litiu, sărurile de seleniu, teluritul de potasiu, tetrationatul etc., care au acţiune bacteriostatică asupra tulpinilor de *E. coli.* Tulpinile de *E.coli* sunt sensibile la acţiunea bacteriofagilor; iar unele tulpini sunt lizogene. Rezistenţa tulpinilor de *E.coli* faţă de antibiotice şi chimioterapice este în creştere, mediată în unele cazuri de plasmide R.

E. coli este cea mai abundentă în conținutul intestinului gros, reprezentând până 1% din totalul populației bacteriene. *E. coli* are capacitatea de a ocupa nișe ecologice cu condiții diferite: crește anaerob și aerob. Intestinul oferă predominant condiții anaerobe, dar habitatul în strânsă proximitate cu celulele epiteliale unde O_2 difuzează din capilarele sanguine, creează condiții aerobe. *E. coli*, inclusă în stratul de mucus ce acoperă epiteliul intestinal, crește cu un timp de generație de 40–80 min. Populația de celule *E. coli* din conținutul luminal al cecumului rozătoarelor este în faza staționară și este eliminată în materiile fecale.

Deși *E. coli* este un organism comensal al intestinului, diferit de tipurile virulente, produce frecvente infecții digestive, ale tractului urinar, ale plămânului și chiar ale sistemului nervos. Este un patogen oportunist și poate determina un proces infecțios, depinzând de densitatea populației bacteriene și de factori predispozanți: compromiterea funcției de apărare și creșterea permeabilității barierei intestinale. Astfel, septicemia cu *E. coli* la pacienții debilitați își are originea în tractul gastrointestinal și nu din contaminarea exogenă cu *E. coli*. Tulpinile comensale de *E. coli* supraviețuiesc și cresc în mediul extern. Este rezistentă la o varietate de factori fizici și chimici, la care se adaptează supraviețuind perioade lungi fără creștere. Solul, apa și alimentele sunt habitatele alternative extraintestinale ale *E. coli*.

Tulpinile patogene de *Escherichia coli*, care au dobândit seturi de gene de virulență, sunt capabile să producă diferiți factori de virulență (fimbrii, capsulă, toxine, siderofori) (fig. 125).

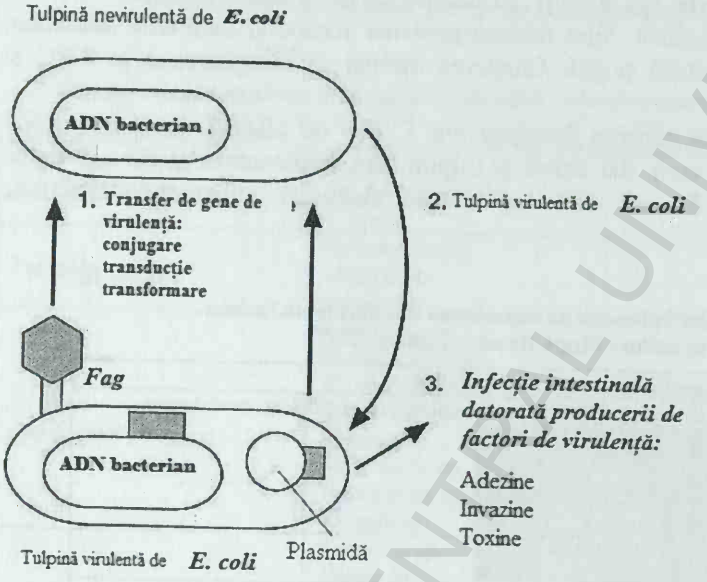


Fig. 125. Reprezentarea modului de selectare a tulpinilor virulente de *E. coli* după dobândirea genelor de virulență prin transfer orizontal http://129.109.115.69/microbook/images/fig7_2.jpg (după Iglewski și Clark, 1990).

Există unele tulpini de *E. coli* defective, nepatogene, altele care prezintă toți factorii de patogenitate caracteristici speciei, precum și unele dotate cu doar unii dintre aceștia în asociații foarte diferite. Astfel de tulpini, în cazul contaminării intestinului cu număr foarte mare de bacterii, pot genera:

- enterite grave, mai ales la sugar, la copil și la adultul vulnerabil;
- infecții extraintestinale, când contaminează zone ale organismului sterile în mod natural (ITU, infecții pulmonare, meningite, infectarea plăgilor, septicemii-bacteriemii).

ITU. E. coli determină peste 90% din totalul *infecțiilor tractului urinar* (ITU) (uretrocistite, cistite, nefrite și pielonefrite) însoțite de procente mari de bacteriemie. Colonizarea tractului urinar este inițiată de *invazia mucoasei* destinsă prin stază, urmată de progresia ascendentă a infecției, spre rinichi, împotriva fluxului urinar descendent. În rinichi, infecția se localizează cu predilecție în zona medulară. Tulpinile nefropatogene de *E. coli* produc hemolizină. Pielonefrita (infecția epiteliului tubilor renali) este produsă de tulpinile cu pili P, care se leagă de moleculele P de grup sanguin de pe membrana celulelor epiteliale ale tubilor renali.

80% dintre tulpinile de *E. coli* care produc meningite și septicemii (la nou-născuți) posedă Ag K1, asemănător polizaharidul meningococului de tip B.

Colibacilii dau, mai rar, peritonite, infecții ale vezicii biliare, ale plăgilor și arsurilor, bronhopneumonii, meningite neonatale. Tulpinile patogene de *E. coli* posedă diferite adezine care se deosebesc prin capacitatea de hemaglutinare, morfologie, antigenitate și specificitate de receptor.

Diareea adultului și *enterita gravă a sugarului* sunt tulburări inițiate de pătrunderea, autoselecția și proliferarea tulpinilor enteropatogene (EPEC, ETEC) în intestinul subțire (jejun și/sau ileon), urmată de invadarea mucoasei. Se estimează că în lume se produc în fiecare an un miliard de episoade diareice, dintre care 3,3 milioane sunt fatale, ceea ce plasează tulburările diareice pe locul doi în topul bolilor infecțioase letale. *E. coli* are proprietăți speciale care-i permit să treacă din mediul colonului, în alte nișe lipsite de competiția cu alte specii bacteriene. Colibacilii sunt agenții etiologici ai peritonitei, infecțiilor vezicii biliare, ale plăgilor și arsurilor, bronhopneumoniei sau meningitei neonatale.

La persoanele cu disfuncții imunitare, septicemia poate fi secundară ITU și se datorează trecerii *E. coli* în sânge.

Meningita la copii este produsă cu cea mai mare frecvență de *E. coli* și streptococii de grup B.

Caractere de patogenitate și virulență

Patogenitatea tulpinilor de *E.coli* este datorată unor factori de virulență asociați peretelui celular (factori de aderență și colonizare antigenică, antigene capsulare, antigenul somatic O) sau solubili (hemolizine, enterotoxine, siderofori) (tabelul 17).

Tabelul 17.

Factorii de virulență și formele clinice produse de diferite patovarietăți de *E. coli* (după Croxen and Finlay, 2009).

E. coli	Boala	Factori de virulență
ETEC	Diaree *cholera-like*	LT, ST, (CFA/I, CFA/II, CFA/III)
EIEC	Diaree apoasă, dizenterie	Ipas, sisteme de secreție de tip III (Mxi și Spa), VirG/IcsA
EPEC	Diaree apoasă	Esp, sisteme de secreție de tip III (Sep și Esc), intimină, Tir și BFP
EHEC	Colită hemoragică, sindrom hemoragic uremic	Factori EPEC, toxină *Shiga like*, hemolizină
EAEC	Diaree apoasă, mucoasă	AAF, EAST-1, Pet, Pic, hemolizină fimbrii F1845 și AIDA-I
DAEC	Diaree persistentă	Pili de tip I, pili de tip P, adezine afimbriale (Afa), hemolizine, CNF-1
UPEC	ITU	Capsulă, pili de tip I, adezine S-fimbriale, invazine IbeA și
SEC	Sepsis, meningită	IbeB

Tulpinile patogene de *E. coli* posedă diferite adezine care se deosebesc prin capacitatea de hemaglutinare, morfologie, antigenitate și specificitate de receptori.

După natura lor chimică, antigenele K se împart în două categorii:

- antigene K de natură polizaharidică (K1);
- antigene K de natură proteică (K_{88}, K_{99});

Antigenele K_{88} produc aglutinarea hematiilor de cobai, iar antigenele K_{99}, a celor de cal. Antigenele K_{88} și K_{99} mediază aderența *in vitro* și *in vivo* a bacteriilor la celulele epiteliale ale intestinului subtire (Burows, 1976). Ambele antigene sunt codificate de plasmide.

Antigenele K polizaharidice sunt trei factori antigenici diferiți (antigenele L, A și B). În general, o tulpină de *E. coli* produce un singur antigen K.

Specificitatea antigenului O este dată de secvența glucidică a catenei polizaharidice din molecula LPS. S-au identificat peste 170 serogrupe ale Ag O de *E. coli*.

Antigenul H, cu peste 50 de variante serologice, identifică serotipul *E. coli*. Serotipurile de *E. coli* sunt combinații specifice de antigene O și H.

Antigenul K identifică tulpinile de *E. coli* prin specificitatea antigenică a capsulei. De exemplu, *E. coli* K1 este cea mai comună cauză a faringitei bacteriene la copii.

Cele mai multe tulpini bacteriene produc proteine termolabile de suprafață, cu structură filamentoasă, vizibile la microscopul electronic: fimbrii diferite din punct de vedere antigenic de Ag O, H sau K.

Toxigeneza. O toxină comună bacteriilor patogene Gram negative, este *antigenul somatic O,* de natură glico-lipo-polipeptidică, termostabil. Rezistă la acțiunea alcoolului, formolului și acidului clorhidric.

Hemolizinele, codificate de plasmida Hly, produc liza hematiilor de la diferite specii de animale. *E. coli* produce 2 tipuri de hemolizine:

- α, filtrabilă, antigenică;
- β, legată de corpul bacterian, nefiltrabilă, neantigenică.

E. coli produce două *enterotoxine:*

- *enterotoxina termolabilă** (LT), cu greutate moleculară de 86,5 kDa. Are proprietăți antigenice şi este asemănătoare cu toxina holerică din punct de vedere al structurii, funcției şi mecanismului de acțiune (Levine, 1983);
- *enterotoxina termostabilă* (ST), cu greutate moleculară de 1,5–5 kDa, lipsită de proprietăți antigenice (Sack, 1980).

* Enterotoxina TL are proprietăți de adjuvant, stimulator al imunității mucoaselor, dar nu este secretată de celula bacteriană. De aceea, trebuie extrasă din celule, clivată enzimatic şi redusă înainte de a-şi produce efectul toxic. Enterotoxina TL se leagă de gangliozidul Gm1, ceea ce întârzie şi îi reduce efectul enterotoxic. Ca adjuvant, enterotoxina TL poate fi administrată fără să fie asociată cu un purtător, simultan cu antigenul oral (Johnson, 1994).

În funcție de mecanismele de patogenitate, epidemiologie, serotip, de manifestările clinice, de modul de aderență, de capacitatea de a invada epiteliul intestinal, tulpinile de *E. coli* care determină tulburări diareice sunt împărțite în şase *virotipuri sau patotipuri sau patovarietăți*: EPEC, ETEC, EHEC, EIEC, EAEC, DAEC, iar cele extraintestinale (ExPEC de la *extraintestinal enteropathogenic E. coli*) în două virotipuri: UPEC şi SEC. Virotipia corelează mai direct diferitele tulpini de *E. coli* cu procesul patologic, decât cu serotipia.

1) *Tulpinile enteropatogene* (*enteropathogenic E. coli* EPEC): serogrupurile O (O26, O55 etc.) posedă o plasmidă de aproximativ 60 kDa, denumită EAF (*entero-adherence factor*), care determină capacitatea acestor tulpini de a produce un tip de aderență localizată la celulele liniei HEp-2. Tulpinile EPEC produc diareea infantilă severă la copii mai mici de 1 an, la viței, purcei, miei. Aderența este urmată de ataşarea intimă a bacteriilor la suprafața celulelor gazdă, mediată de o proteină a membranei externe – *intimina*, considerată factor de virulență a tulpinilor EPEC.

Tulpinile EPEC formează una dintre cele câteva grupe de tulpini diareice de *E. coli*, care produc cazuri sporadice de diaree şi se deosebesc de alte tulpini de *E. coli*, prin capacitatea de a produce leziuni caracteristice în enterocitele intestinului subțire, cu modificări ale citoscheletului şi pierderea microvililor ce formează bordura în perie. Patogeneza cu EPEC parcurge 3 stadii:

- EPEC se ataşează de celulele mucoasei intestinului subțire, într-o asociație labilă, prin intermediul fimbriilor. Genele pentru aderență sunt plasmidiale;
- celulele epiteliale activează tirozin-kinazele şi nivelul Ca^{2+} intracelular creşte;
- după aderența inițială la epiteliu, tulpinile EPEC se ataşează strâns de membrana celulei epiteliale, ducând la dezorganizarea microvililor la zona de contact. Astfel de modificări histopatologice sunt cunoscute sub denumirea de *a*taşare (*a*ttaching) şi dezorganizarea (*e*ffacement) microvililor (A/E). La zona de contact a bacteriilor cu suprafața celulei epiteliale, prin reorganizarea actinei, se formează structuri pseudopodiale în formă de cupă, ce constituie "piedestale" ce se alungesc progresiv, iar bacteria rămâne ataşată la partea superioară. Suprafața piedestalului păstrează conformația curbă a bacteriei, iar distanța dintre celula bacteriană şi membrana citoplasmatică este mai mică de 10 nm. La nivelul structurii piedestal se găsesc proteine ale citoscheletului (actină, actinină, catena uşoară a miozinei etc.), iar microfilamentele sunt dens împachetate.

Ataşarea strânsă a celulei bacteriene şi modificările structurale locale materializate în formarea piedestalului necesită o proteină bacteriană denumită *intimină* şi sistemul de secreție de tip III. Intimina se leagă specific de o proteină a membranei celulei epiteliale. Proteina, a cărei origine pare a fi bacteriană, denumită *Tir* (*r*eceptorul *t*ranslocat al *i*ntiminei), este translocată şi inserată în membrana celulei epiteliale prin mecanismul de secreție de tip III (fig. 126, 127).

Alte 2 proteine secretate, *Esp A* şi *Esp B*, de asemenea translocate în citosolul celulei eucariote, sunt necesare pentru inserția membranară a *Tir*. Tulpinile EPEC sintetizează şi transferă propriul lor receptor, pentru legarea strânsă de celula eucariotă.

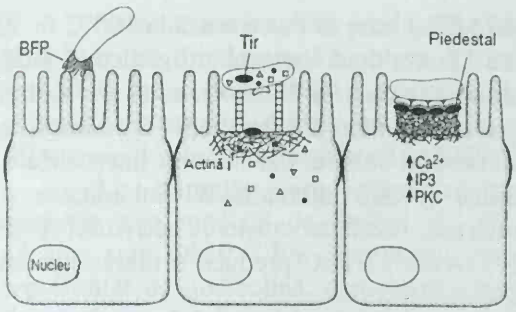


Fig. 126. Etapele colonizării enterocitelor de către EPEC (Lu şi Walker, 2008).

Fig. 127. Imagine de microscopie electronică de *scanning* a unei celule de EPEC aderată la un piedestal de actină (http://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/Images/EPEC-pedestal-on-ntestinal.jpg).

Tulpinile EPEC secretă cel puţin 25 de polipeptide, care se găsesc în supernatantul culturii tisulare.

EPEC nu produce toxine, iar diareea este probabil consecinţa lezării celulelor intestinale, care nu mai absorb eficient apa.

Tulpinile EPEC se caracterizează prin modul aglomerat al aderenţei de celulele epiteliale (fig. 128), care determină formarea microcoloniilor pe suprafaţa celulei, şi prin incapacitatea de a produce toxina *Shiga*.

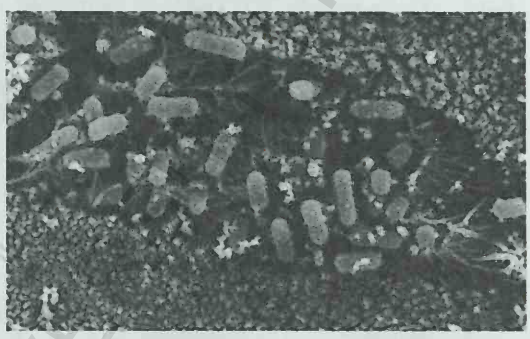


Fig. 128. Imagine de microscopie electronică de *scanning* a unei microcolonii de celule de EPEC (albastru) aderate la lumenul intestinal cu pierderea microvililor (gri) în zonele cu bacterii aderate (http://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/Images/efacement.jpg).

2) *Tulpinile enterotoxigene (ETEC) (enterotoxigenic E. coli)* sunt agenţii etiologici ai "diareei călătorilor" şi produc o tulburare diareică asemănătoare cu cea produsă de *V. cholerae*. Se transmit prin alimente şi apă contaminată. Produc câteva tipuri de fimbrii cu rol de factori de colonizare CFA I şi CFA II, deoarece au rolul de a adera la celulele mucoasei, permiţând ETEC să colonizeze intestinul subţire. CFA I şi CFA II se găsesc numai la tulpinile diareagenice.

Sinteza adezinelor este codificată de plasmide.

După aderenţă şi colonizarea mucoasei intestinului subţire, tulpinile ETEC determină un sindrom diareic prin inhibarea resorbţiei ionilor de sodiu şi a apei, datorită producerii şi eliminării unor exotoxine, cu tropism pentru celulele intestinale (fig. 129).

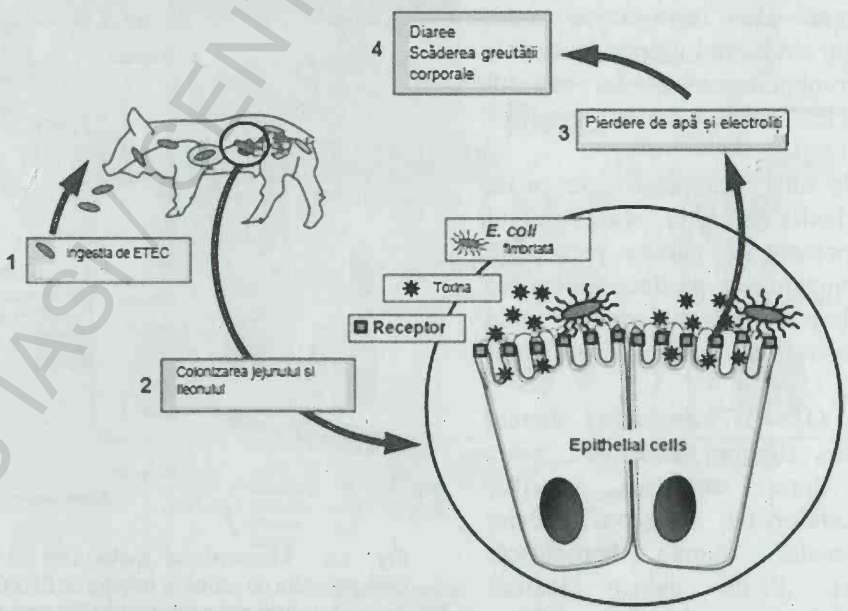


Fig. 129. Etapele infecţiei cu ETEC (adaptat după http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/pathogenesis.asp).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tulpinile ETEC eliberează o *enterotoxină termolabilă* (TL), care se inactivează la 100°C în 30 de minute, şi o *enterotoxină termostabilă* (TS). Enterotoxina TL are două variante antigenice (1 şi 2). LT 1 are un grad înalt de identitate cu secvenţa de aminoacizi a toxinei de *V. cholerae* şi are acelaşi plan structural: o subunitate A (activă) şi 5 subunităţi de legare B (*binding*). Subunităţile B se leagă de un gangliozid specific (GM1) al celulelor epiteliale ale intestinului subţire, dar nu sunt internalizate. Subunitatea A se activează prin clivajul legăturii peptidice şi este internalizată. Subunitatea A catalizează ADP-ribozilarea adenilat ciclazei legată de membrană, rezultând creşterea activităţii AMP ciclic şi creşterea secreţiei de fluide şi electroliţi (fig. 130). Astfel, ETEC produce o diaree apoasă neinflamatorie, asemănătoare cu cea produsă de infecţia cu *V. cholerae*.

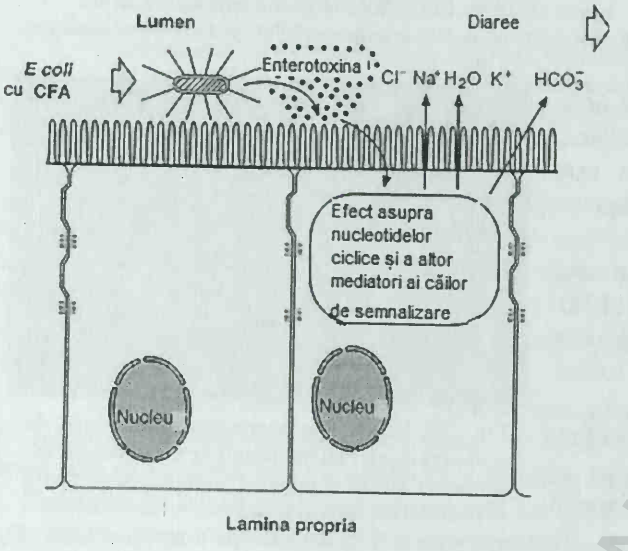


Fig. 130. Mecanismul producerii diareei apoase de către tulpinile de ETEC (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/pathogenesis).

Toxinele TS sunt peptide mici (18–50 aminoacizi). Toxina TS-1 se leagă de un receptor glicoproteic, activând o guanilat-ciclază legată de membrană. Creşterea GMP ciclazei creşte secreţia fluidelor şi electroliţilor, rezultând o diaree apoasă asemănătoare celei produse de toxina TL.

3) *Tulpinile EHEC* (*enterohaemorrhagic E. coli*) (serogrupul O157:H7) secretă cito-toxine puternice, denumite toxine *Shiga-like* (SLT I , SLT II) sau verotoxina (VT), deoarece sunt asemănătoare din punct de vedere anti-genic şi funcţional cu toxina Shiga clasică secretată de *S. dysenteriae*. SLT I este identică cu toxina Shiga, iar SLT II are omologie de 56%.

Structural, SLT este formată din 2 componente (A, B): o subunitate A şi 5 subunităţi B identice. Subunitatea B se leagă de un glicolipid membranar, iar subunitatea A este internalizată şi produce moartea celulei prin inhibiţia sintezei proteinelor, împiedicând legarea aminoacil-ARNt de codonul ARNm.

SLT produsă de EHEC produce tromboza capilară şi inflamaţia mucoasei colonului, consecinţa fiind *colita hemoragică*.

E. coli O157:H7 este serotipul asociat cu colita hemoragică, produce diaree sanguinolentă şi alte complicaţii care periclitează viaţa: sindromul uremic hemolitic şi purpura trombocitopenică. La nivelul enterocitelor, EHEC produce leziuni specifice de tip A/E (131).

Bovinele sunt principalul rezervor de EHEC, cu rate înalte de portaj fecal. Agentul patogen este prezent în carnea proaspătă, deoarece contaminarea se produce în timpul sacrificării. Adeseori, infecţia omului este cauzată de consumul cărnii insuficient prelucrată termic.

E. coli O157:H7 determină diaree, colite hemoragice, sindrom hemolitic uremic (hipertensiune, dureri de cap, letargie, convulsii, encefalopatie, trombocitopenie, insuficienţă renală, anemie hemolitică, microangiopatie). Poate induce leziuni specifice la nivelul enterocitelor, de tip A/E.

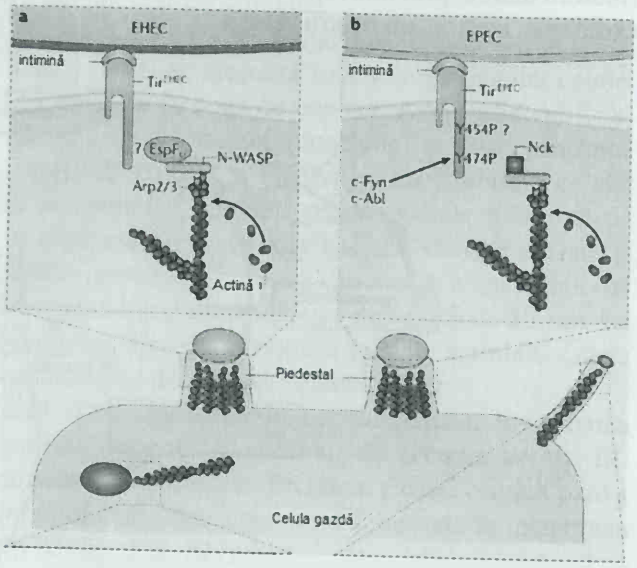


Fig. 131. Mecanismele moleculare ale formării piedestalurilor de actină în infecţia cu EHEC şi EPEC http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n5/images/nrmicro1391-f3.jpg.

Toxina termostabilă produsă de acest patovar (STEC) produce efect citopatic ireversibil pe linia Vero E6, fiind numită verotoxină, similară cu toxina produsă de *Shigella* şi neutralizată de serul anti-STX. Într-o primă etapă a procesului infecţios, tulpina aderă la mucoasa intestinală (rezistentă la pH acid) de manieră difuză sau produce, similar cu EPEC, leziuni A/E mediate de plasmida de 60 MDa, *eae* (de curând demonstrată în EHEC);

La tulpinile care infectează porcul, aderenţa este mediată de fimbrii, F 107; alte adezine sunt OMP, LPS. Receptorul pare a fi reprezentat de nucleolină, o proteină exprimată doar de celulele din criptele intestinale (fig. 132), care se divid şi au o durată de viaţă mai mare decât a celulelor care migrează spre lumen şi care vor fi distruse (Shin et al., 2000; Sinclair & O'Brien, 2002).

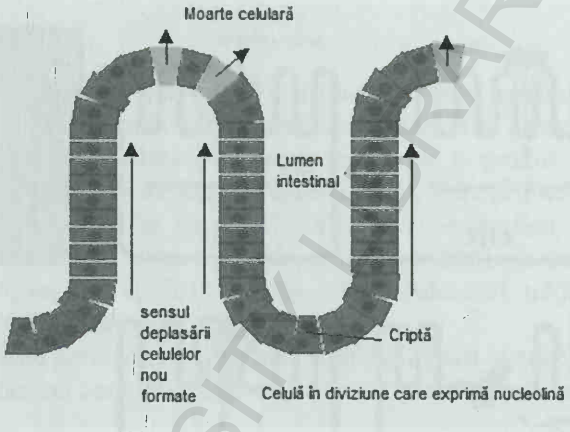


Fig. 132. Reprezentarea turn-over-ului celulelor lumenului intestinal (Sinclair et al., 2002).

Ulterior, toxina SXT se leagă de GM_3, care are densitate crescută în rinichi, mai ales în regiunea corticală unde se situează leziunile la pacienţii cu SHU (sindrom hemolitic uremic); după interacţiunea cu GM_3 endoteliul capilarelor renale este distrus, leziuni apărute fiind urmate de depunerea fibrinei şi a plachetelor în capilarele granulare, ocluzia capilarelor, reducerea fluxului sangvin în rinichi şi insuficienţă renală.

EHEC produce de asemenea leziuni trombotice în intestin, creier, pancreas. Se pare că leziunile induse de SXT sunt dependente de nivelul de TNF, IL-1 şi LPS. De asemenea, în sângele bolnavilor cu SHU s-au evidenţiat concentraţii ridicate de IL-8, activator şi chemoatractant al PMN (acesta din urmă indică inflamarea glomerului renal).

Alţi factori de virulenţă sunt *enterohemolizina*, care produce un fenotip non-hemolitic, codificată de plasmida de 60 MDa, pO157; *serin proteaze*, cu efect citotoxic asupra celulelor Vero E6, codificate plasmidial, care nu clivează IgA1, dar clivează pepsina şi factorul de coagulare V (conducând la exacerbarea simptomelor hemolitice), al căror rol lor în patogeneză este susţinut de prezenţa Ac specifici.

4) *Tulpinile enteroinvazive* (*enteroinvasive E. coli* EIEC) penetrează şi se multiplică în celulele epiteliale ale colonului, producând modificări ale mucoasei intestinale şi simptome asemănătoare cu cele determinate de *Shigella* sp., cu care sunt foarte asemănătoare genetic (nu se pot distinge prin hibridizarea ADN/ADN) (fig. 133). Virulenţa este dependentă de prezenţa unei plasmide de invazie şi constă în ulceraţii ale mucoasei digestive cu apariţia scaunelor muco-sanguinolente.

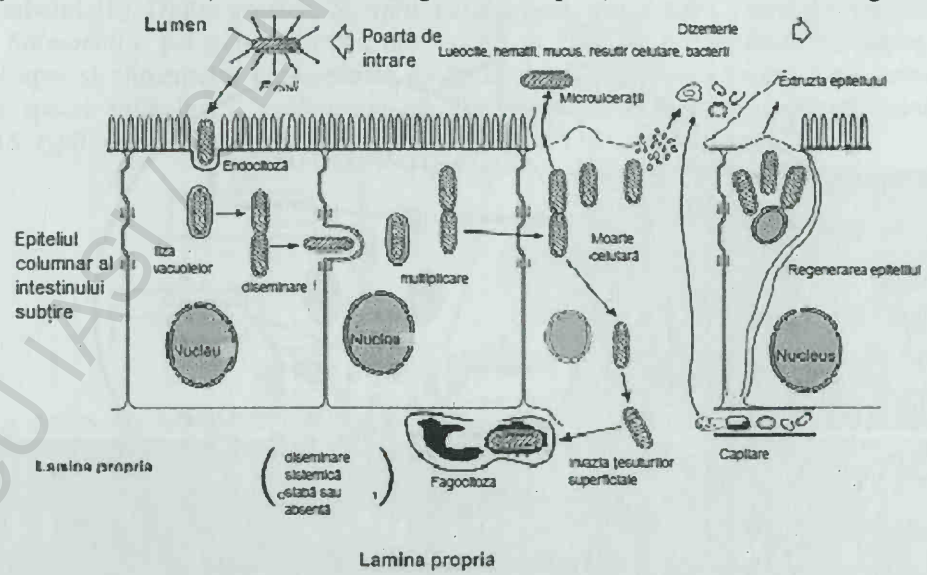
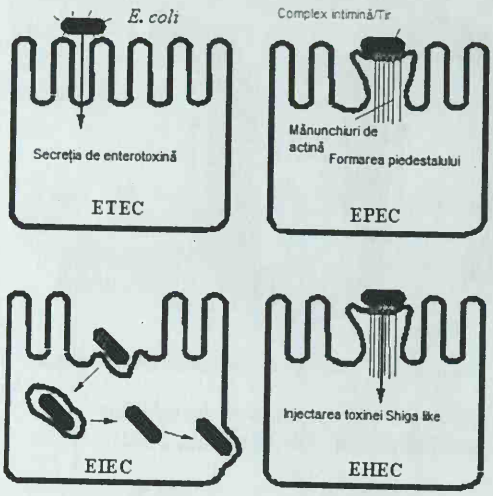


Fig. 133. Mecanismul patogenezei produse de tulpinile de EIEC (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/ Bpathogenesis).

Ca şi tulpinile de *Shigella sp.*, sunt invazive pe culturi celulare şi pozitive la testul Szereny (de producere a keratoconjunctivitei pe ochiul de cobai).

Invazia celulelor intestinale (ca şi pentru tulpinile EPEC, EIEC, EHEC) se face prin modificări ale microtubulilor citoscheletului şi, în general, nu este urmată de multiplicarea bacteriilor în celula gazdă, fiind doar o modalitate de a persista în organismul gazdă (fig. 134).



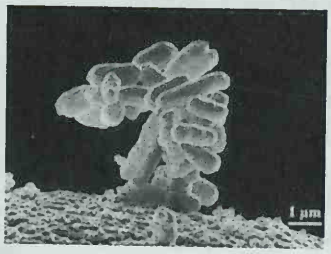


Fig. 135. Imagine de microscopie electronică de temperatură joasă (x 10000) a unui agregat de EaggEC aderat la mucoasa intestinală (http://emu.arsusd).

Fig. 134. Interacţiunea diferitelor patovaruri de *E. coli* cu celula gazdă intestinală (http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/Bacteria%20Inv.htm).

5) *Tulpinile enteroaderente sau enteroagregative* (EAggEC), aparţin ultimului patovar descris, au proprietatea de a adera la culturile celulare în monostrat, având un fenotip agregativ (fig. 135). Tulpinile EAEC produc diaree datorită unei toxine ST-*like* (EAST) şi o exotoxină de 120 kDa, asemănătoare cu hemolizina produsă de tulpinile uropatogene.

6) *Tulpinile difuz-aderente* (DAEC) la suprafaţa celulelor eucariote în cultură, determină diaree la copiii mai mari de 18 luni. Este ultimul virotip de *E. coli* care a fost descris.

7) *Tulpinile* de UPEC (*uropathogenic E. coli*) produc infecţii ale tractului urinar inferior care pot progresa pe cale ascendentă. Aceste tulpini prezintă adezine cu care aderă la celulele epiteliului tractului urinar, pentru a nu fi eliminate odată cu urina (prin adezine de tip I – manozo rezistente, de tip P la 80% din tulpinile implicate în pielonefrite, de tip S, AFA sau X); prezintă de asemenea rezistenţă la activitatea bactericidă a serului (hemolizine, siderofori).

8) SEC (*septic E. coli*) produce infecţii generalizate complicate cu şoc septic şi meningită, factorii de virulenţă fiind pe de o parte reprezentaţi de structurile de aderenţă şi invazie, iar pe de altă parte de mecanismele de evitare a efectorilor imunitari (fig. 136).

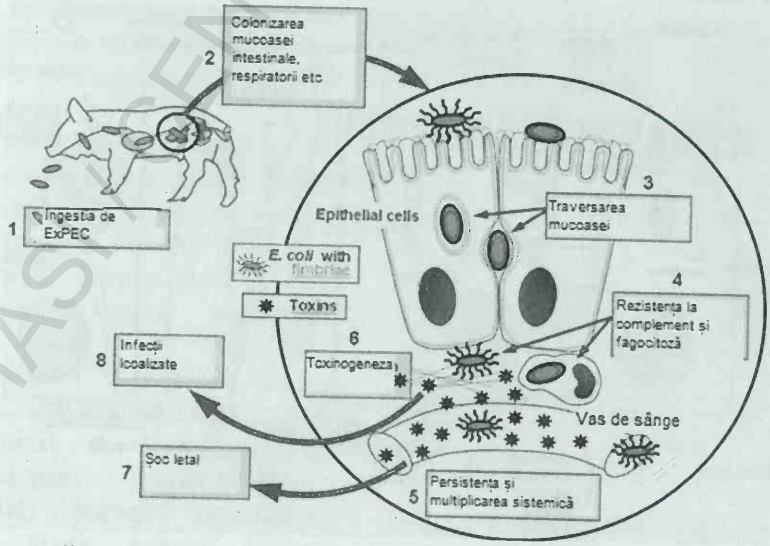


Fig. 136. Etapele infecţiei produse de patovarietăţile extraintestinale (adaptat după http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/pathogenesis.asp).

BCU IAŞI

Epidemiologie. E. coli şi coliformii populează tractul digestiv în câteva zile după naştere şi constituie proporţia majoră a microbiotei aerobe, facultativ anaerobe. Prezenţa acestor enterobacterii în apă, lapte, este acceptată ca dovadă a contaminării cu fecale din apa de canal sau din alte surse. Unele tulpini pot deveni agenţi ai infecţiilor nosocomiale.

7.1.2. Genul *Salmonella* sp.

Salmonella este agentul etiologic al *salmonelozei*, una dintre cele mai frecvente boli transmise pe cale digestivă. Salmonelele sunt larg răspândite în natură, toate serotipurile cunoscute fiind parazite pentru om şi animale. Speciile de *Salmonella* infectează o varietate de gazde vertebrate şi produc un spectru relativ larg de maladii: gastroenterită, bacteriemie, febră enterică (enterocolită), infecţii focale, toate originare din infecţia enterică. Unele au spectru larg de gazdă (*S. enterica typhimurium, S. enteridis, S. choleraesuis*), iar altele sunt foarte restrictive (*S. enterica typhi*, aproape exclusiv la om), *S. pullorum* (la păsări), *S. dublin* (la bovine), *S. arizone* (la reptile) (Darwin, 1999). Adeseori, tulpini diferite de *Salmonella* produc entităţi clinice distincte la gazde diferite.

Salmonella, descrisă în 1880 de Eberth, este unul dintre cei mai studiaţi agenţi patogeni. Denumirea s-a dat după numele lui Daniel E. Salmon, cel care a izolat *S. enterica* serovar *choleraesuis* din intestinul de porc.

Genul *Salmonella* cuprinde bacili Gram negativi, mobili, patogeni. Clasificarea iniţială a fost făcută pe baa criteriilor epidemiologice, a spectrului de gazdă, a reacţiilor biochimice şi a structurii antigenice.

Metodele de diagnostic sunt bacteriologice şi serologice. *Salmonella* sp. se izolează, din sânge sau/din scaun, prin cultivare repetată pe medii diferenţiale. În cazul febrei enterice, scaunul este pozitiv, iar în cazul septicemiei, cultivarea sângelui este adeseori pozitivă. *Salmonella* sp. se izolează pe mediul MacConkey, EMB sau dezoxicolat, pe care se evidenţiază coloniile care nu fermentează lactoza (*Salmonella sp., Shigella sp., Proteus sp., Serratia sp., Pseudomonas sp.*). *Salmonella* sp. produce H_2S şi coloniile sunt negre datorită formării sulfitului de bismut.

Speciile genului *Salmonella* sp. necesită confirmare serologică, pentru a putea fi diferenţiate de unele tulpini cu profil biochimic similar de *Citrobacter sp., Hafnia sp., Proteus sp., E. coli* (produce H_2S), *Edwardisella tarda, Alteromonas putrefaciens* (fig. 137–139).

Variabilitatea antigenică la *Salmonella* este foarte mare, existând 170 serogrupuri. În laboratorul clinic s-au izolat peste 1400 serotipuri, în funcţie de diferenţele structurale ale *antigenului H* (flagelar), ţinta principală a acţiunii anticorpilor specifici, grupate la rândul lor, în funcţie de *specificitatea antigenului O în grupurile A, B, C_1, C_2, D şi E.* Unele sunt netipabile serologic.

Există serovarietăţi strict adaptate la gazda umană sau la o specie animală, în general auxotrofe (tabelul 18). Dintre acestea, *S. typhi*, paratyphi A, paratyphi C, sendai reprezintă serovaruri majore de *Salmonella*, patogene strict la om, agenţi ai sindromului tifoidic, transmise la om prin intermediul apei şi alimentelor contaminate de bolnavi sau purtători cronici. Alte serovarietăţi sunt adaptate la specii animale (*S. gallinarum,* abortus ovi/equi). Unele serovarietăţi sunt ubiquitare, prototrofe (*S. typhimurium, S. enteritidis*), dar pot produce TIAC.

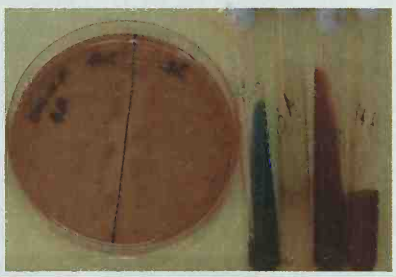


Fig. 137. Profilul biochimic al unei tulpini de *Salmonella sp.*

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI
BIOLOGIE

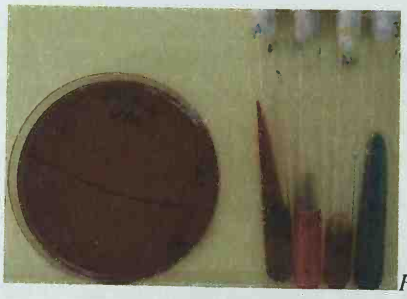


Fig. 138. Profilul biochimic al unei tulpini de *Proteus mirabilis.*

Fig. 139. Profilul biochimic al unei tulpini de *Enterobacter cloacae.*

Tabelul 18.

Formulele antigenice reprezentative ale serogrupurilor implicate în patologia umană (Brooks şi colab., 2007).

Grup O	Serotip	Formula antigenică (antigenul O, Vi, antigenul H-fazaI, fazaII)
D	*S.typhi*	**9, 12** (Vi):d: –
A	*S. paratyphi A*	**1, 2, 12:**a –
C_1	*S. choleraesuis*	**6, 7:**c:1,5
B	*S. typhimurium*	**1, 4, 5, 12:**i:1, 2
D	*S.enteritidis*	**1, 9, 12:**g, m: –

Mai puţin de 10 serotipuri din cele peste 2500 identificate prin teste biochimice şi serologice, produc majoritatea infecţiilor: *S. typhmurium, S. enteridis, S. heidelberg, S. newport, S. paratyphi A* (serogrup A), *S. paratyphi* B (serogrup B), *S. cholerae suis* (serogrup C), *S. typhi* (serogrup D), dar şi alte serotipuri produc febra enterică (febra tifoidă) la om şi reprezintă o problemă de sănătate publică. *S. typhimurium* produce infecţii asemănătoare la şoarece.

După ultima clasificare, bazată pe reacţiile de hibridare ADN-ADN, se admite că toate tulpinile de *Salmonella* formează un continuum, nu sunt specii diferite, ci aparţin unei singure specii- *S. enterica* – cu peste 2500 de *variante serologice* (antigenice). În consecinţă, nomenclatura folosită curent cu gen şi specie (*S. typhi, S. typhimurium*) este incorectă. Studiile de hibridare ADN-ADN au evidenţiat existenţa a *7 grupe evolutive* (Brooks şi colab., 2007). Aproape toate variantele antigenice infecţioase pentru om aparţin grupei I de hibridare. Denumirea de *S. enterica* ssp. (subspecia) *enterica* este acceptată pentru tulpinile grupei I, iar celelalte grupe de hibridare aparţin altor subspecii. Denumirea corectă propusă este cea de *S. enterica*, ssp. *enterica* serotip typhimurium (prescurtat *S. typhimurium*). Denumirea de gen se scrie cu caractere italice, iar serotipul, cu caractere romane).

Structura antigenică

Antigenul O prezintă caracteristicile structurale comune enterobacteriilor.

Antigenul de înveliş (K) (germ. *Kapsel* = capsulă), desemnat şi cu prescurtarea Vi, a fost descris de Pitt (1935) la *S. typhi*. Din punct de vedere chimic este glico-lipo-polipeptidic. De cele mai multe ori se găseşte în cantitate prea mică pentru a forma o structură capsulară vizibilă, dar este

suficient pentru a masca Ag O şi pentru a inhiba aglutinarea celulelor, în prezența serului specific anti-O. Fenomenul O-inaglutinabilității tulpinilor bogate în antigen Vi poate fi interpretat fizico-chimic, ca rezultat al competiției celor două antigene pentru suprafața celulei.

Liniile bacteriene care au antigen Vi, vor fi aglutinate numai de Ac anti-Vi sau anti-H.

Antigenul Vi se deosebeşte de Ag O prin conținutul mai ridicat în acizi graşi. Este rezistent la alcool, dar se inactivează prin fierbere timp de două ore, ceea ce permite "demascarea" antigenului O. Astfel, celulele devin aglutinabile în prezența anticorpilor specifici anti-O.

Antigenul Vi se găseşte la puține serotipuri de *Salmonella*, cărora le conferă rezistență la fagocitoză.

Infecția cu o tulpină de *Salmonella* care posedă toate cele trei tipuri de antigene, determină apariția în ser a anticorpilor specifici, anti-O, anti-H şi anti-Vi. Identificarea anticorpilor anti-Vi se poate face numai după îndepărtarea anticorpilor anti-O şi anti-H, prin absorbția serului cu o tulpină lipsită de Ag Vi.

Prin trecerea formelor coloniale S (*Smooth*) în forme coloniale R (*Rough*) au loc modificări chimice profunde ale antigenului O, între care şi înlocuirea totală sau parțială a complexului polizaharidic al formelor S, cu lipide caracteristice formelor R. Celulele tulpinilor care cresc sub forma coloniilor R tind să aglutineze spontan şi se numesc variante antigenice R. Aceste celule nu au antigenele O şi Vi, dar dacă sunt mobile, au antigene H.

Organismele pot pierde antigenul H şi devin *imobile* sau pierd antigenul O (prin sinteza incompletă a LPS, căreia îi lipseşte regiunea polizaharidică externă, asociată cu trecerea de la colonii de tip S, la colonii de tip R). Antigenul Vi este pierdut parțial sau complet. Antigenele sunt pierdute sau recâştigate prin evenimente de transducție.

Morfologie. Salmonelele sunt bacili Gram negativi, necapsulați, de 2–4 μm lungime şi 0,6 μm diametru, mobili, cu flageli dispuşi peritrich (fig. 140).

Fig. 140. Imagine de microscopie electronică, prin tehnica coloraţiei negative, a unei celule de *Salmonella* sp. cu flageli dispuşi peritrih (www.healthhype.com/tag/salmonella).

Pe medii nutritive simple, salmonelele se dezvoltă rapid, în 6 ore în mediu lichid şi 24 ore pe mediu solid, cu colonii de tip S sau R.

S. paratyphi A, S. abortus ovis, S. typhi suis, S. sendai cresc puțin pe medii nutritive simple, generând colonii mici, transparente. *S. typhi* poate de asemenea să dezvolte colonii mici sau pitice care revin la forma normală prin trecerea pe medii cu lichid de ascită 10% sau tiosulfat de sodiu 0,1%.

Pe geloză cu sânge, salmonelele se dezvoltă fără producere de hemoliză (fig. 141).

Pe medii selective, cu lactoza ca indicator, formează colonii lactozo-negative nefermentative tipice (fig. 142–145): necolorate, semitransparente, bombate, uneori cu zona centrală colorată în negru (pe mediu ADCL la 48 ore), determinând o uşoară alcalinizare a mediului.

Fig. 141. Aspectul culturii de *Salmonella* pe geloză-sânge (Todar, 2009).

Pe medii selective ce conțin pe lângă lactoză şi alte zaharuri, aspectul coloniilor este diferit: roşu închis pe geloza XDL, albastru închis cu centru uneori negru pe agar HE şi roşu intens cu virajul mediului în roşu pe AVB.

Pe geloza Wilson-Blair coloniile sunt caracteristice după 48 ore de incubare: neregulate, opace, cu suprafața rugoasă şi margini neregulate, cu halou negru cu luciu metalic. Unele tulpini de *S. typhi* şi suspensiile dense din alte serotipuri determină colonii mici, verzui, cu marginile şi suprafața uşor rugoase, fără halou.

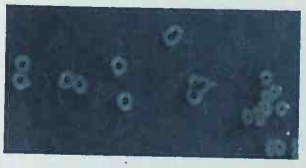


Fig. 142. Aspectul culturii de *Salmonella* pe mediul Hektoen (Todar, 2009).

Fig. 143. Aspectul culturii de *Salmonella* pe mediul AVB (http://microblog.me.uk/wp-content/uploads/salmonella_BGA.jpg).

Fig. 144. Aspectul culturii de *Salmonella* pe mediu XDL (Todar, 2009).

Fig. 145. Aspectul culturii de *Salmonella* pe mediul Wilson Blair (http://www.mikrobiyoloji.org/_0.jpg).

Caractere metabolice.

- cresc pe medii cu citrat ca unică sursă de carbon (Simmons);
- decarboxilează arginina şi ornitina;
- produc hidrogen sulfurat (cu unele excepţii);
- fermentează glucoza, manitolul, sorbitolul şi ramnoza cu producere de gaz şi pozitivarea reacţiei cu roşu de metil;
- nu produc fenilalanin-dezaminază, urează şi indol;
- nu degradează esculina;
- nu produc acetoina;
- nu dau reacţie pozitivă la testul Voges-Proskauer;
- produc lizin-decarboxilaza;
- nu cresc pe medii de cultură cu cianură de potasiu (excepţie: serotipurile din subgenurile IV şi V).

Rezistenţa la agenţi chimici, fizici şi biologici. Fiind organisme nesporulate, salmonelele sunt puţin rezistente la căldură. La 60°C culturile mor în 15–20 minute, iar la 100°C, în 5–7 minute. *S. senftenberg* (una dintre cele mai termorezistente salmonele cunoscute) rezistă 12 minute la 65,5°C şi 33 minute la 60°C. În alimente supravieţuirea este variabilă (între 10–180 zile), în funcţie de concentraţia de săruri şi pH.

Congelarea bruscă determină o reducere considerabilă a numărului de salmonele (până la 90%) în primele zile.

Salmonelele se dezvoltă bine la pH = 6 – 8,2. Valorile acide ale pH (sub 3,5) nu permit supravieţuirea mai mult de 6–12 ore. La pH > 9, dezvoltarea este inhibată.

Dezinfectantele de uz curent (sublimatul 1/1000, fenolul 5/1000, formolul 5/1000) omoară salmonelele în intervalul 30 minute – 2 ore. Concentraţiile saline mai mari de 8% nu permit creşterea salmonelelor. Sărurile biliare, deoxicolatul de sodiu, coloranţii din grupa trifenilmetanului (verde briliant, cristal violet, fucsina) au acţiune inhibitorie redusă. Antibioticele şi chimioterapicele au acţiune bacteriostatică sau bactericidă asupra salmonelelor. *S. typhi* este sensibilă la cloramfenicol, ampicilină. Celelalte serotipuri frecvent întâlnite la om sunt sensibile la tetraciclină, colimicină, ampicilină.

Patogeneză. Factorii majori de virulenţă la *Salmonella* sunt *endotoxinele, exotoxinele* şi *fimbriile.* Endotoxina conferă specificitatea serologică tulpinii. *Exotoxinele* termolabile sunt parţial asemănătoare cu cele de *E. coli.* Fimbriile mediază contactul şi aderenţa celulelor bacteriene cu celulele epiteliale. Se disting mai multe tipuri de fimbrii: fimbrii de tip 1 (Fim), fimbrii codificate de plasmide (PE), fimbrii polare lungi (LP) şi fimbrii subţiri spiralate (curli). Aceste tipuri distincte de fimbrii au tropism specific pentru un anumit tip celular sau pentru celule de la diferite specii de animale.

Salmonella traversează bariera epiteliului intestinal, în special la nivelul celulelor M, care acoperă plăcile Peyer (fig. 146). Celulele M au rolul de a pinocita antigenele solubile din lumenul intestinal, dar preiau şi antigene particulate (virusuri, bacterii, protozoare). Înglobarea bacteriilor nu este urmată de degradare lizosomală. Bacteriile intacte sunt transportate în vezicule care fuzionează cu membrana laterobazală şi sunt transferate celulelor subiacente (macrofage şi neutrofile), unele specializate în prelucrarea şi prezentarea antigenelor, fenomen denumit *transcitoză.* Antigenele sunt prelucrate în celulele dendritice şi în macrofagele subepiteliale şi sunt prezentate limfocitelor locale

sau sunt transferate celulelor interdigitate şi prezentate celulelor T interfoliculare. Celulele interdigitate care prezintă antigenul, derivă din celulele dendritice care au înglobat antigenul. Intrarea în celulele gazdă este condiţia majoră pentru supravieţuire. Neutrofilele au viaţă scurtă, dar au activitate antibacteriană constitutivă şi omoară bacteriile. Fagocitele mononucleare au activitate antibacteriană medie până la intensă, în funcţie de starea de activare. De aceea, ele pot fi efectoare, dar pot constitui şi o nişă de supravieţuire a agentului infecţios.

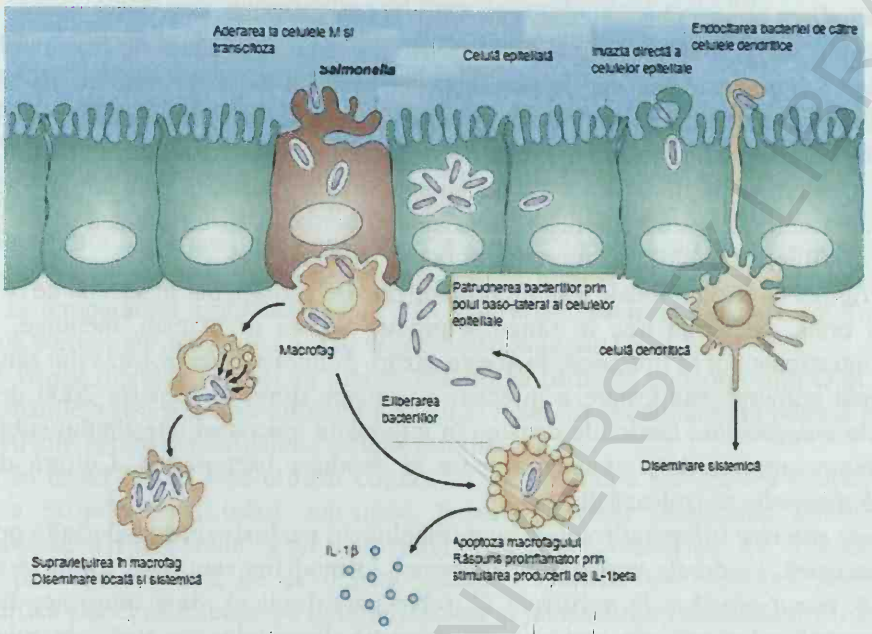


Fig. 146. Invadarea epiteliului intestinal de către *Salmonella* (s2.hubimg.com/u/1366057_f520.jpg).

Invazia fagocitelor neprofesioniste depinde de expresia receptorilor membranari de adezine, care pot fi împrumutaţi pentru invazie. Deoarece nu au activitate antibacteriană, fagocitele neprofesioniste au rolul de habitat. *Salmonella* se multiplică în ţesutul limfoid asociat mucoasei intestinale şi este eliminată în scaun.

În infecţiile experimentale sistemice la şoarece, *Salmonella* pătrunde în mucoasa intestinală şi aderă preferenţial la mucoasa intestinului subţire, unde invadează celulele M ale plăcilor Peyer. Bacteriile pot să distrugă celulele M invadate, precum şi enterocitele adiacente, dobândind accesul la structurile limfoide. Invazia celulelor M este un eveniment activ, deoarece bacteria induce formarea pliurilor membranei apicale a celulei şi astfel bacteria este înglobată.

În ţesutul limfoid subiacent celulelor M invadate, *Salmonella* este fagocitată de macrofagele rezidente. În contrast cu *Sh. flexneri*, *Salmonella* nu părăseşte vezicula de fagocitoză. Bacteria supravieţuieşte şi se multiplică în interiorul veziculei, datorită sistemului de secreţie de tip III ce interferă cu maturarea fagosomului şi cu eliberarea enzimelor hidrolitice, rezultând o vacuolă care adăposteşte *Salmonella*. Vacuola este transportată prin sistemul filamentelor de actină, în regiunea perinucleară. *Salmonella* lizează vacuola şi devine liberă în citoplasmă, protejată de un înveliş de actină.

Macrofagul este celula care vehiculează şi diseminează agentul infecţios pe calea ţesutului limfoid al gazdei. Bacteriile se acumulează şi se multiplică masiv în ficat, splină, măduva osoasă, toate bogate în celule fagocitare. Consecinţa este insuficienţa funcţională a organelor infectate, septicemia şi moartea la 4–6 zile după infecţie.

Capacitatea de a supravieţui şi de a se multiplica în fagocitele profesioniste este considerată ca fiind un factor esenţial de virulenţă a speciilor de *Salmonella* care produc infecţii sistemice. Factorii de virulenţă, transportorii de ioni, sistemele de secreţie celulară etc., sunt codificaţi de două aglomerări de gene: SPI-1 şi SPI-2 (*S*almonella *p*athogenicity *i*sland).

Celulele speciilor de *Salmonella* sunt singurele descrise care conţin 2 sisteme de secreţie de tip III (Hueck, 1998). Cele două sisteme de secreţie de tip III au, probabil, roluri diferite în patogeneză:

SPI-1 ar fi necesară pentru penetrarea mucoasei intestinale, iar SPI-2, pentru stadiile ulterioare, sistemice, ale infecției.

Patologie. S. typhi este înalt virulentă pentru om, dar nevirulentă pentru șoarece. *S. typhimurium* este virulentă pentru șoarece și puțin virulentă pentru om. Unele serotipuri sunt înalt patogene atât pentru om, cât și pentru animale. Salmoneloza este transmisă prin alimente. La gazdele sensibile, *S. enterica* produce enterocolită medie, până la diaree severă. Tulpinile care trec prin epiteliul intestinal pot produce bacteriemie, care duce la febră tifoidă.

Sindromul *febrei tifoide* este manifestarea clinică majoră, produsă de mai multe serotipuri de *Salmonella*, dar *S. typhi* este cea mai importantă. Perioada de incubație este de 10-14 zile. Infecția clinică este asociată cu febra, starea de rău general, durere de cap, bradicardie, mialgie. Splina și ficatul cresc în volum. Leziunile principale sunt hiperplazia și necroza țesutului limfoid din plăcile Peyer, hepatita, necroza focală a ficatului, inflamația vezicii biliare, a plămânului etc. Complicația majoră a infecției netratate este hemoragia intestinală și perforația. Mortalitatea este de 10–15%, dar tratamentul cu antibiotice reduce rata mortalității la mai puțin de 1%.

Bacteriemia cu leziuni focale este produsă de oricare serotip, dar în special de *S. cholerae suis*. După infecția orală, bacteriile trec în sânge și produc leziuni în plămân, meninge, oase etc., dar manifestările intestinale pot să lipsească. În aceste cazuri, *Salmonella* se izolează din sânge.

Cea mai comună manifestare a infecției cu oricare dintre cele peste 2000 de serotipuri de *Salmonella* este *enterocolita*. Leziunile constau în inflamația mucoasei intestinului subțire și gros. La persoanele imunocompromise și imunodeficitare se produce bacteriemia. Cultura din sânge este negativă, dar *Salmonella* se izolează din scaun.

Febrele enterice (tifoparatifoidice) sunt îmbolnăviri exclusiv umane, definite printr-o evoluție febrilă, caracteristică, cu durata variabilă, determinate în mod frecvent de *S. typhi* (febra tifoidă), *S. paratyphi A, S. paratyphi B și S. paratyphi* C (febre paratifoidice). Sunt transmise fie prin contact strâns cu o persoană colonizată sau, mai ales, prin ingestia alimentelor sau apei contaminate cu excreta de la persoanele colonizate.

Pentru inițierea unei infecții la om, prin consumul alimentelor contaminate, sunt necesare 10^5–10^6 celule bacteriene, în funcție de starea fiziologică a gazdei (Darwin și colab., 1999). Numărul relativ de celule este necesar pentru depășirea barierei acide a stomacului și pentru competiția cu microbiota normală a tractului intestinal. Infecția este favorizată de consumul băuturilor contaminate, deoarece traversează rapid compartimentul gastric. Alimentele care neutralizează aciditatea (brânzeturi, lapte) favorizează inițierea procesului infecțios. Indivizii umani cu hipoaciditate gastrică sunt mai sensibili la procesul infecțios. Se apreciază că în prezent se produc cel puțin 16 milioane de cazuri noi de febră tifoidă, cu 600000 morți/an.

Perioada de incubație este de 6–48 de ore, urmată de manifestările clinice: dureri de cap și abdominale, diaree (uneori sanguinolentă și bogat mucilaginoasă), vomă. Simptomatologia generală (alterarea stării generale, febră, stare de șoc) este determinată de cantitatea mare de *endotoxine* eliberate de salmonele. Evoluția prelungită a bolii și diseminarea largă sunt explicate prin capacitatea *S. typhi* de a supraviețui și chiar de a se *multiplica* în interiorul macrofagelor. Anticorpii serici care realizează titruri mari din a 3-a săptămână după infecție și unele antibiotice sunt ineficiente în această situație. Febrele enterice conferă o imunitate de lungă durată care persistă în majoritatea cazurilor, toată viața.

Manifestările encefalitice ale febrei enterice apar la circa 5% din totalul cazurilor.

Gastroenterita este forma comună de îmbolnăvire determinată de celelalte serotipuri, în afara celor menționate în etiologia febrelor enterice (*Salmonella net*ifoidă = NTS). Tulpinile NTS sunt prima sursă de gastroenterită și sunt larg răspândite: în tractul gastrointestinal al mamiferelor domestice și sălbatice, al păsărilor, reptilelor, insectelor. Infecția se produce prin ingestia unei cantități mari de microorganisme vii (peste 10^5 celule), de regulă prin intermediul unui aliment contaminat, preparat neadecvat (carne, ouă, produse lactate). În gastroenterite imunitatea este de scurtă durată, protecția fiind insuficientă față de cantitatea imensă de microorganisme ce reprezintă „doza infectantă". *Septicemia* poate să apară ca o complicație a unei toxiinfecții alimentare.

Simptomele clinice dispar într-o săptămână, dar *Salmonella* poate fi eliminată cu fecalele timp de circa 20 de săptămâni, la copiii de până la 5 ani şi circa 8 săptămâni de către adulţi. La copiii cu vârsta de până la un an şi la adulţii de peste 60 de ani, infecţia gastroenterică este mai gravă.

Metodele de *diagnostic sunt bacteriologice şi serologice. Salmonella* se izolează, din sânge sau/din scaun, prin cultivare repetată pe medii diferenţiale. În cazul febrei enterice, scaunul este pozitiv, iar în cazul septicemiei, cultivarea sângelui este adeseori pozitivă. *Salmonella* se izolează pe mediul MacConkey, EMB sau dezoxicolat, pe care se evidenţiază *coloniile care nu fermentează lactoza* (genurile *Salmonella, Shigella, Proteus, Serratia, Pseudomonas*). *Salmonella* produce H_2S şi coloniile sunt negre datorită formării sulfitului de bismut.

Metodele *serologice* se folosesc pentru determinarea titrului de anticorpi la pacienţii cu maladie necunoscută.

Testul aglutinării pe lamă (serotipizarea) este o metodă rapidă şi sensibilă de identificare a culturii de *Salmonella*. O ansă de ser imun cu specificitate cunoscută şi o cantitate mică de celule din colonie sau din cultura bacteriană neidentificată, crescute pe mediu agarizat, se amestecă pe lama de microscop. Aglutinarea, dacă se produce, apare în câteva minute şi se observă la microscop, cu un obiectiv mic, la temperatura ambiantă sau la 37^0C. Serurile imune comerciale aglutinează specific antigenele O ale serogrupurilor A, B, C_1, C_2, D şi E de *Salmonella*.

Testul Widal (metoda diluţiei în tuburi) determină titrul de anticorpi anti-O şi anti-H. Titrul creşte în săptămânile a II-a şi a III-a după infecţia cu *S. typhi*. Se recoltează cel puţin 2 probe de ser la interval de 7–10 zile pentru evidenţierea creşterii titrului.

Iniţial în testul Widal s-au utilizat culturi bacteriene totale. Pe măsura cunoaşterii structurii antigenice şi a extinderii vaccinării anti-tifice, testul a devenit insuficient, datorită posibilităţii interpretării eronate a rezultatelor. Folosind culturi bacteriene totale, cu tot complexul antigenic, reacţia Widal pune în evidenţă, pe de o parte *anticorpi anti-H*, care sunt puternic stimulaţi prin vaccinare specifică sau după infecţie cu tulpini flagelate şi persistă timp îndelungat, iar pe de altă parte nu oferă nici un indiciu pentru infecţiile produse de variante neflagelate.

Din aceste motive, varianta iniţială a testului Widal a fost înlocuită cu analiza serică de ordin calitativ, în care se folosesc cele două variante antigenice: *O*, sub forma suspensiei celulare alcoolate şi *H*, ca suspensie celulară formolată.

Aglutinarea mediată de Ag H se citeşte după o incubare de 2 ore la 37°C (sau 52°C) şi 10 min. la temperatura camerei, iar cea mediată de Ag O se citeşte după o incubare de 20 de ore la 37°C şi 10 min. la temperatura camerei. Aglutininele anti-H şi anti-O apar în ser, la un titru scăzut, în prima săptămână după infecţie. Titrul lor creşte şi atinge valoarea maximă între 16 şi 29 zile de la infecţie şi rămâne ridicat în convalescenţă şi o perioadă scurtă după vindecare.

Aglutininele anti-H au titru înalt, de 1/1000–1/5000, iar aglutininele *anti-O* au titru de 1/250–1/1000. Seroreacţia calitativă poate fi considerată ca un indiciu al unei infecţii tifo-paratifoide, la titrul de cel puţin 1/500 pentru aglutininele anti-O şi la titrul de cel puţin 1/1000 pentru aglutininele anti-H.

În unele situaţii, reacţia de aglutinare bacteriană nu are sensibilitatea necesară. Alteori reacţia este fals negativă, deoarece antigenele celulei bacteriene nu sunt expuse la suprafaţă şi nu sunt accesibile reacţiei cu anticorpi. Antigenele capsulare maschează antigenul somatic O al peretelui bacterian. Se impune utilizarea unui preparat antigenic bacterian supus în prealabil tratamentului termic (prin fierbere), cu scopul de a expune antigenul O al suprafeţei celulare.

Utilitatea reacţiei este limitată datorită prezenţei anticorpilor ce dau reacţie încrucişată cu antigenele de *Salmonella*, iar interpretarea rezultatelor testului impune prudenţă.

Epidemiologie. Salmonella infectează în condiţii naturale numeroase specii de animale (cornute, păsări, rozătoare), care poartă agentul infecţios în lumenul intestinal, în ţesuturi (în special în organe) şi îl elimină în materiile fecale, lapte sau ouă.

Infecţia se transmite indirect prin alimentele şi apa contaminate, sau direct de la omul bolnav sau infectat, la cel sănătos sau de la animale la om. Marea majoritate a salmonelelor sunt infecţioase pentru animale. Acestea constituie rezervorul pentru infecţiile umane. Cele mai comune surse de contaminare sunt carnea de vită, de pasăre, de porc şi ouăle. Ouăle pot fi contaminate prin microfisurile din coajă sau infecţia este transovariană din ovarul sau din oviductul infectat. La acest nivel, sacul vitelin (gălbenuşul) este contaminat înainte de depunerea cojii. Acest mod de

transmitere este greu de controlat, deoarece găinile outoare sunt asimptomatice. Contaminarea internă a ouălor este produsă, cel mai adesea, de *S. enteritidis*. În carnea de pasăre s-a raportat o incidență crescută a contaminării cu *Salmonella*. Utilizarea masei miceliene după extracția antibioticului, în hrana animalelor, a selectat tulpinile rezistente şi a crescut incidența infecțiilor umane prin consumul cărnii contaminate.

Alte surse de infecție sunt laptele şi produsele derivate (înghețată, brânzeturi), moluştele din apa contaminată. Infecția poate fi transmisă de animale de casă: câine, pisică, broasca țestoasă.

O altă sursă de infecție o reprezintă *purtătorii* sănătoşi sau convalescenți. După infecția clinică unii indivizi continuă să poarte *Salmonella* în țesuturi (în special în vezica biliară) pentru perioade variabile şi să elimine agentul infecțios.

În 1991 s-a descoperit un nou gen, *Trabulsiella gnamensis*, asemănător cu *Salmonella*.

7.1.3. Genul *Shigella*

Primul raport despre izolarea şi caracterizarea bacteriei care produce dizenteria a fost publicat de K. Shiga la sfârşitul secolului 19. S-au descris 4 specii de *Shigella: Sh. dysenteriae* (subgrupul serologic A), *Sh. flexneri* (subgrupul B), *Sh. boydii* (subgrupul C) şi *Sh. sonnei* (subgrupul D). *Sh. sonnei* este agentul etiologic a 2/3 din cazurile totale de shigeloză, restul fiind produse de *Sh. flexneri*. Specificitatea serologică este conferită de polizaharidul regiunii externe a LPS. În funcție de variațiile antigenului O, speciile au fost divizate în serotipuri. S-au identificat peste 40 de serotipuri ale celor 4 specii.

Caractere morfologice. Shigella sp. are necesități de creştere asemănătoare altor enterabacterii, dar este inhibată de microbiota Gram negativă. În culturi pure formează colonii circulare lucioase translucide sau uşor opace şi nehemolitice pe geloză sânge. Sunt bacili Gram negativi de dimensiuni medii (2–3 μ lungime şi 0.5–0.7 μ grosime), fără flageli şi nu formează spori.

Mărimea coloniilor variază în cadrul celor 4 subgrupe. *Sh. sonnei* poate disocia în colonii netede (faza1) plate, cu marginile neregulate şi colonii (de faza 2) asociate cu pierderea plasmidei de virulență şi cu schimbarea specificității antigenice. Prin subcultivare, coloniile de faza 1 pot trece ireversibil la cele de faza 2, trecerea fiind corelată cu modificarea tipului de colonie de tip S (neted), la colonii de tip R.

Caractere de cultură, biochimice şi de metabolism.

Bacilii dizenterici sunt aerobi, facultativ anaerobi, cresc bine pe mediile de cultură uzuale, la temperatura optimă de 37°C (cu limite între 10°C şi 45°C), la un pH optim de 7,2. În bulion şi apă peptonată, formele "S" tulbură uniform mediul, în timp ce formele R sedimentează.

Pe geloza nutritivă 2% pH 7.2, după 24 de ore de incubare la 37°C, se dezvoltă colonii cu diametrul de 1–3 mm, uşor translucide, convexe sau uşor aplatizate, cu suprafața netedă, cu margini mai mult sau mai puțin regulate. Fac excepție formele "R" care prezintă colonii turtite, suprafața lor având un aspect uscat, uşor încrețit, cu margini foarte neregulate.

Sunt oxidazo-negative, catalazo-pozitive (cu excepția *Sh. dysenteriae* tip 1), glucoza este fermentată fără producere de gaz, cu excepția unor biotiopuri de *Sh. flexneri* 6); nu fermentează lactoza (cu excepția *Sh. sonnei* care o fermentează tardiv); nu pot utiliza citratul şi malonatul ca unică sursă de carbon, nu scindează ureea, nu produc hidrogen sulfurat, nu decarboxilează lizina.

Subgrupa A (*Sh. dysentariae*) cuprinde tulpini lactozo-negative, manito-negative. În subgrupul A, serotipul *Sh. dysentariae* tip I (bacilul Shiga) nu produce indol, este catalazo- negativ şi nu fermentează ramnoza, în timp ce serotipul *Sh. dysentariae* 2 (bacilul Schmitz) produce totdeauna indol, este catalazo-pozitiv şi fermentează aproape totdeauna ramnoza. Majoritatea tulpinilor de *Sh. dysentariae* tip 5 fermentează dulcita şi toate tulpinile aparținând serotipurilor *Sh. dysentariae* 7 şi 8 produc indol. Serotipul *Sh. dysenteriae* 1 se deosebeşte de toate celelalte shigelle prin sinteza unei exotoxine cu acțiune predominant neurotropă.

Subgrupa B (*Sh. flexneri*) cuprinde tulpini lactozo-negative care fermentează manita (cu excepția biotipului Newcastle al serotipului 6, a unui biotip manito-negativ al serotipului 4a şi rare excepții pentru celelalte serotipuri).

Subgrupa C (*Sh. boydii*) cuprinde tulpini lactozo-negative, care fermentează de asemenea manita (cu foarte puține excepții), dar care se deosebesc de subgrupa B, prin structura lor antigenică.

În subgrupa C, serotipurile 5, 7, 9, 11, 13 şi 15 sunt indol pozitive. Ramnoza nu este, în general, fermentată (excepții pentru tulpini ale serotipului 9). Pentru dulcită şi xiloză reacțiile sunt variabile (de la un serotip la altul şi la tulpinile aceluiaşi serotip).

Subgrupa D cu specia *Sh. sonnei* cuprinde bacili manito-pozitivi, dar care fermentează lactoza (de obicei tardiv). Tulpinile sunt indol negative şi, în general, ornitin-pozitive (uneori şi arginin-pozitive).

Habitatul natural este tractul intestinal al omului şi al altor primate, la care produce *dizenteria bacilară*. Creşterea este optimă în aerobioză, dar bacteria este facultativ anaerobă.

Enterobacteriile din grupul *Shigella* se găsesc în intestinul şi scaunul bolnavilor de dizenterie şi ale purtătorilor temporari sau cronici. Dintre animale, în mod natural se îmbolnăvesc maimuțele, care de asemenea pot elimina bacilii dizenterici. Timpul de generație este de aproximativ 40 minute, iar perioada de incubație este, în medie, 3 zile. Calea de contaminare este fecal-orală, prin ingestia hranei sau apei contaminate.

Toate cele 4 subgrupe de *Shigella* au fost izolate în țări tropicale şi subtropicale din toată lumea. În ultimii 30 de ani, *Sh. dysenteriae 1* a determinat epidemii majore în America Centrală (1969–1970), Africa de est (1991), iar *Sh. boydii* este mai frecventă în sudul Asiei şi Orientul Mijlociu; în Europa şi America de Nord predomină *Sh. sonnei* urmată de *Sh. flexneri*.

Structura antigenică. Antigenul major al shigellelor este cel somatic lipopolizaharidic "O", termostabil. La tulpinile de *Sh. dysenteriae* şi *Sh. boydii* neaglutinabile a fost descris un material capsular (Ewing 1986, Rowe 1990).

Sh. dysenteriae eliberează o exotoxină termolabilă (toxina Shiga) cu acțiune toxică asupra mucoasei şi vililor, dar şi neurotoxice. Toxina Shiga are o greutate moleculară de 50–1000 kDa, difuzează extracelular, este foarte puternică şi are un grad înalt de specificitate. Cauzează leziuni locale hemoragice care duc la sângerări şi secreții mucoase masive.

Toxina Shiga este alcătuită din 2 subunități, A (enzimatică) şi B (de legare), într-o proporție de 1:5 şi produce efectul *citotoxic*: subunitatea B leagă glicolipidele celulelor colonului, iar domeniul A este internalizat prin endocitoza mediată de receptori şi inactivează ireversibil subunitatea ribosomală 60S, efectul fiind necroza celulelor prin inhibarea sintezei proteinelor.

Efectul *enterotoxic*: toxina Shiga blochează absorbția electroliților, glucozei şi a aminoacizilor din lumenul intestinal, aderând la receptori ai enterocitelor intestinului subțire.

Efectul *neurotoxic*: febra şi crampele abdominale sunt considerate semne de neurotoxicitate.

Sh. flexneri şi într-o măsură mai mică *Sh. sonnei* sunt endemice şi produc majoritatea infecțiilor. *Sh. dysenteriae* produce focarele epidemice şi cea mai severă formă de dizenterie.

Infecția cu *Shigella* este aproape totdeauna limitată la tractul gastrointestinal. Rareori traversează peretele intestinal şi trece în sânge. 10^3 celule produc infecția (10^5–10^8 celule de *Salmonella* şi *Vibrio*).

Shigella se transmite pe cale fecal-orală, prin ingestia alimentelor sau a apei contaminate. Bacteria este foarte infecțioasă: 10-100 celule de *Sh. flexneri* sunt suficiente pentru a iniția procesul infecțios, pentru că supraviețuieşte acidității gastrice şi inhibă sinteza peptidelor antimicrobiene, efectori anti-infecțioşi importanți secretați de celulele mucoasei tractului digestiv. După ce trece de stomac şi de intestinul subțire, *Shigella* ajunge în colon, unde este inițiat procesul infecțios propriu-zis. *Shigella* invadează celulele cu vili ale colonului, se multiplică şi produc abcese şi ulcerații ale mucoasei (scaunele sunt afecaloide, muco-sangvinolente, prezintă leucocite, hematii). Invazia se limitează la mucoasa coloniului, dar bacteriile nu trec dincolo de epiteliu, în lamina propria, nu perforează intestinul şi nu invadează sângele.

Infecția parcurge mai multe etape:

– *Sh. flexneri* nu invadează polul apical al enterocitelor, dar traversează stratul celulelor epiteliale, fiind înglobată de celulele M şi eliberată prin transcitoză într-o pungă intraepitelială unde macrofagele rezidente din țesutul limfoid asociat mucoaselor, fagocitează şi degradează materiale străine (fig. 147). După ce sunt endocitate, celulele bacteriene rezistă în interiorul macrofagului prin liza fagosomului şi prin inducerea

apoptozei celulare. Apoptoza macrofagelor este însoțită de eliberarea IL-1, care recrutează PMN și duce la infiltrarea masivă a țesutului infectat. Moartea macrofagelor este însoțită de eliberarea citokinelor proinflamatorii (IL-1 ß și IL-18). Ambele stimulează inducerea răspunsului inflamator acut și intens. IL-18 activează celulele NK și stimulează sinteza IFN γ (fig. 148);

Fig 147. Imagine electrono-optică a unei celule bacteriene de *Shigella* în endosomul macrofagului.

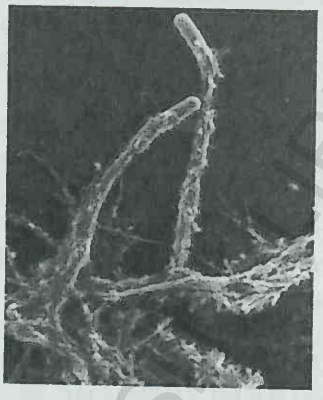


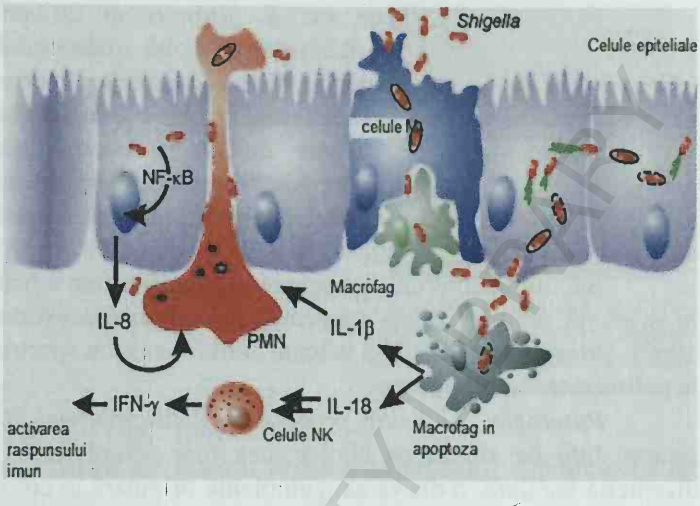
Fig. 148. Evidențierea prin microscopie electronică de *scanning* a cozilor de actină formate adiacent celulelor de *Shigella* internalizate med.mui.ac.ir/slide/bactrio/bactrio3.html.

- *Sh. flexneri* eliberată din macrofage, aderă prin *adezine* tip invazine (*invasion plasmid antigens* = Ipa; *surface presentation antigens* = Spa; *membrane excretion proteins* = Mxi; *virulence proteins* = Vir) și invadează polul laterobazal al enterocitelor prin inducerea fagocitozei, lizează fagosomul, trece în citoplasmă după circa 15 minute și se multiplică. Liza membranei fagosomului nu este dependentă de pH acid, ci este mediată de proteine translocate din celula bacteriană, direct în membrana țintă prin sistemul de secreție de tip III. La 37°C, proteina VirF induce sinteza proteinei VirB care activează expresia genelor *ipa, mxi* și *spa* care codifică sinteza unui complex proteic denumit *translocon Mxi-Spa.* Compexul *Mxi-Spa* se activează la contactul bacteriei cu membrana enterocitului și secretă invazinele IpaB, IpaC și IpaA care activează căile de semnalizare ale gazdei și declanșează *endocitoza.* După ce sunt internalizate, celulele scapă din endosom prin intermediul proteinelor Ipa, componente ale complexului de transport de tip III, care transferă în celula gazdă moleculele efectoare ale activării programului apoptozei;
- se deplasează prin polimerizarea orientată a actinei și se diseminează în celulele adiacente, evitând astfel contactul cu efectorii imunitari (fig. 148).
- invazia celulelor epiteliale stimulează răspunsul inflamator, cu recrutarea masivă a neutrofilelor în focarul infecțios. Neutrofilele extravazate lezează stratul enterocitelor, permițând bacteriilor luminale să ajungă direct în submucoasă, fără să traverseze celulele M. Distrugerea severă a epiteliului mucoasei tulbură absorbția apei, a nutrienților și a electroliților. Astfel se produce diareea apoasă, sanguinolentă și mucilaginoasă a shigelozei. În final, neutrofilele recrutate în focar fagocitează și omoară celulele bacteriene, procesul infecțios fiind, de cele mai multe ori, autolimitant (fig. 149).

Spre deosebire de speciile de *Yersinia*, care au localizare extracelulară, speciile de *Shigella* sunt predominant localizate în interiorul celulei. Strategia mecanismului de virulență este, ca și în cazul speciilor de *Yersinia*, activitatea sistemului de secreție de tip III.

Proteinele inductoare ale apoptozei macrofagelor, cu rol determinant al invazivității bacteriei, sunt secretate pe calea sistemului III. Invazivitatea bacteriană în macrofagele foliculilor limfoizi este condiționată de secreția a 4 proteine: *Ipa A, Ipa B, Ipa C, Ipa D.* Înainte de contactul cu celula țintă, *Sh. flexneri* depozitează în citoplasmă proteinele Ipa, iar după contactul cu ținta celulară, le transferă în celula gazdă prin sistemul de secreție de tip III.

Fig. 149. Mecanismele patogenității la *Shigella* ssp. *S. flexneri* traversează bariera epitelială prin transcitoză la nivelul celulelor M şi întâlneşte macrofagele rezidente. Bacteria induce apoptoza macrofagelor şi apariția unui raspuns inflamator. Celulele bacteriene eliberate din macrofagul lizat invadează celulele epiteliale la polul bazolateral, pătrund şi se deplasează în citoplasmă prin polimerizarea directă a actinei şi invadează celulele adiacente. Citokinele proinflamatorii produse de macrofage şi celulele epiteliale invadate activează răspunsul imun înnăscut ce implică celulele NK şi atrag polimorfonuclearele. Afluxul PMN dezintegrează bariera epitelială, exacerbează infecția inițială şi distruge țesutul, facilitând astfel invazia bacteriană. În final, PMN fagocitează şi omoară bacteriile, astfel că leziunile apărute sunt autolimitate (adaptare după Gunnar, 2008).



Pe lângă cele 4 proteine Ipa, în supernatantele culturii de *Sh. flexneri* s-au detectat cel puțin alte 6 polipeptide. Proteinele secretate nu au secvență semnal N-terminală şi toate sunt secretate fără prelucrare N-terminală.

Chiar dacă inflamația masivă inițială favorizează tranzitul bacteriilor luminale în submucoasă, se pare că ulterior *Sh. flexneri* secretă molecule care inhibă semnalele proinflamatorii, probabil pentru a echilibra severitatea infecției la un nivel benefic pentru agentul patogen.

Stimularea semnalizării celulare. După ce ajunge în submucoasă, prin transcitoză din celulele M, *Shigella* invadează polul latero-bazal al celulelor mucoasei intestinale, fără specializare funcțională de a endocita. *Sh. flexneri* interacționează cu celula gazdă, ca şi *Salmonella*, cu microdomeniile bogate în colesterol ale membranei plasmatice. Colesterolul este ubicuitar în membrana celulelor eucariote şi îi influențează proprietățile biofizice, conferindu-i rigiditate. Colesterolul nu este distribuit unitar în membrană, ci este concentrat în anumite microdomenii bogate în fosfolipide şi proteine denumite *pontoane* (*rafts*) *lipidice*. În microdomeniile lipidice, proteinele membranare au o distribuție asimetrică, unele fiind recrutate preferențial, iar altele, excluse. Proteinele asociate pontoanelor lipidice au conexiune funcțională strânsă cu citoscheletul de actină, ceea ce le conferă calitatea de a controla căile de transducție a semnalelor, cum ar fi endocitoza, traficul intracelular al veziculelor, activarea limfocitelor consecutivă legării epitopului, apoptoza. Rolul central al pontoanelor lipidice în rețeaua de semnalizare a celulei eucariote, le face să devină ținte primare pentru agenții infecțioşi care invadează celule nespecializate pentru fagocitoză şi în mod obişnuit endocitează macromolecule în soluție, aşa cum sunt enterocitele.

Patogeneza. Deşi bacteriile extracelulare de *S. flexneri* sunt imobile, cele intracelulare dobândesc *fenotipul "organelle-like movement"* (Olm) care permite celulei bacteriene să „alunece" de-a lungul filamentelor de actină în celula infectată, iar fenotipul *Ics* (*i*ntra*c*ellular *s*preading) permite bacteriilor să se disemineze extracelular şi să infecteze alte celule. Produsul genei icsA determină polimerizarea actinei la polii enterocitului şi apariția unei protruzii sau cilindri de actină prin care bacteriile se deplasează în alte celule, evitând mediul extracelular, în care bacteriile devin imobile.

Invazia intracelulară produce microabcese ale mucoasei în intestinul gros, urmată de degradarea epiteliului şi inflamația laminei propria, descuamarea, ulcerații ale mucoasei, sângerare şi formarea unei pseudomembrane pe aria ulcerată, alcătuită din fibrină, leucocite, resturi celulare şi bacterii.

După autoliză, celulele de *Shigella* eliberează LPS, cu efect iritant asupra mucoasei. Mecanismul molecular al inducerii diareii nu este cunoscut. Faza apoasă pare a fi indusă de enterotoxinele (ShET) 1 şi 2, termolabile. Toxina Shiga produsă de *Sh. dysenteriae* induce efecte citopatice la o varietate de celule *in vitro*, iar *in vivo* produce leziuni vasculare în colon, rinichi şi în SNC (Schroeder şi colab., 2008). *Enterotoxina* produce diaree, inhibă absorbția glucozei şi aminoacizilor în intestinul subțire, este antigenică şi induce sinteza anticorpilor neutralizanți. Exotoxina acționează şi asupra SNC şi amplifică severitatea infecției. Anticorpii nu sunt protectori pentru o reinfecție ulterioară.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Persoanele infectate cu *S. flexneri* şi cu anumite predispoziţii genetice (HLA-B27) pot dezvolta sindromul Reiter (dureri articulare, iritaţii oculare, disurie), care poate dura luni până la ani de zile şi poate genera artrita cronică greu de tratat.

Toate tulpinile virulente de *Sh. flexneri* posedă o plasmidă de virulenţă de dimensiuni mari (230 kb) denumită *plasmidă de invazie*, codificatoare pentru toţi factorii de virulenţă enumeraţi mai sus (fig. 150).

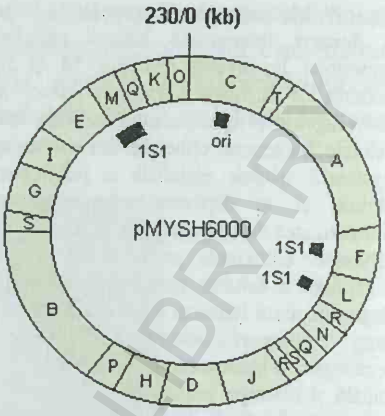


Fig. 150. Harta genetică a plasmidei de *Sh. dysenteriae.*

Bacilii dizenterici sunt primele bacterii la care a fost pusă în evidenţă multirezistenţa transmisă prin plasmide (Watanabe, 1960). *Shigella* este sensibilă la toate antibioticele cu spectru larg, la polimixine, sulfamide.

Patologie. Shigella produce maladia diareică cu un spectru larg de simptome clinice, cea mai severă formă fiind dizenteria bacilară, o diaree sanguinolentă originară în colon. *Sh. dysenteriae* serotip 1 numit şi bacilul Shiga, este singurul agent dizenteric care produce o toxină puternică, generând cea mai gravă formă de dizenterie (cu crampe abdominale intense, febră, 20–100 scaune pe zi cu mucus şi sânge sau chiar hemoragie, cu deshidratare intensă, simptome nervoase). Infecţia este autolimitată, dar poate periclita viaţa persoanelor cu deficit al funcţiei imunitare. La copii poate apărea complicaţia sindromului hemolitic uremic (SHU), datorită creşterii bruşte a temperaturii şi modificărilor metabolice induse de toxina Shiga.

Rehidratarea asociată cu antibioticele sunt măsuri eficiente de tratament al procesului infecţios.

Shigeloza este endemică în ţările în curs de dezvoltare, dar focarele apar în ţările dezvoltate, în condiţii de igienă precară. Cei mai sensibili sunt copiii sub 5 ani. Invazia bacteriană a mucoasei colonului este o treaptă esenţială în patogeneza shigelozei.

Diagnosticul etiologic este bacteriologic. Cea mai bună metodă de recoltare este tamponul rectal. Pentru reuşita izolării este important de reţinut că vitalitatea bacililor dizenterici în scaun, după recoltare, este de scurtă durată, datorită sensibilităţii la fagii specifici şi la antagonismul exercitat de microbiota normală; de aceea, însămânţarea se face cât mai repede, în maxim 1 oră de la recoltare. Tulpinile genului *Shigella* sunt bacili Gram negativi, imobili, care cresc bine pe medii cu bilă (fig. 151). Coloniile *negative pentru lactoză* (fig. 152) se transferă pe mediul TSI (*t*hree *s*ugars *i*ron): nu produc H_2S, nu fermentează lactoza în 24 ore, acidifică coloana de mediu fără producere de gaz şi alcalinizează mediul înclinat (panta). Se pot însămânţa medii selective care inhibă creşterea altor enterobacterii şi a bacteriilor Gram pozitive (fig. 153).

Fig. 151. Evidenţierea imobilităţii în geloza 3‰.

Fig. 152. Aspectul coloniilor bacteriene pe mediu diferenţial AABTL (agar-albastru de brom timol-lactoză)

Fig. 153. Aspectul coloniilor bacteriene pe alte medii diferenţiale.

EUIASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În ser, anticorpii aglutinanți apar după 10 zile.

Shigella se transmite pe cale fecal-orală, de la persoanele infectate la cele sănătoase, prin alimente şi apă contaminate. Infecțiile se produc mai ales la copiii mai mici de 10 ani. După vindecare, pacientul elimină bacili o perioadă scurtă de timp.

Vaccinurile vii orale au dat rezultate bune experimentale pe animale şi voluntari, demonstrând că imunitatea antidizenterică are specificitate de serotip, dar nu este protectoare față de infecții viitoare cu alte serotipuri. sIgA, a cărei sinteză este indusă de vaccinul viu atenuat, administrat pe cale orală, pare a fi importantă pentru limitarea procesului infecțios.

Fig. 154. Aspectul culturii de *Citrobacter freundii* (sus) şi *Enterobacter cloacae* (jos) pe mediu lactozat (colonii lactozo-pozitive).

7.1.4. *Citrobacter freundii* – LAC+ (fig. 154), ONPG+, H_2S+, LDC-. Este patogen oportunist, responsabil de infecții urinare, septicemii, suprainfecții ale tractului respirator. Nu are potențial enteropatogen.

7.1.5. Genurile *Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Serratia* (KEHS) constituie grupul de enterobacterii VP pozitive, sunt patogeni oportunişti (terapie intensivă, urologie, reanimare) mai ales din cauza multirezistenței la antibiotice.

Fig. 155. Aspectul culturii de *Klebsiella pneumoniae* pe mediu lactozat (colonii mucaose, lactozo-pozitive).

Genul *Klebsiella* conține specii imobile, care formează colonii de aspect particular, foarte mucoase (fig. 155), fermentează un număr mare de glucide, posedă ca factori de virulență antigenul capsular K (77 tipuri diferite) cu rol antifagocitar şi protector față de acțiunea letală a serului. Serotipurile capsulare K_1 şi K_6 sunt potențial patogene.

Genul *Klebsiella* – cuprinde 3 specii:

K. pneumoniae – cea mai importantă pentru patologia umană şi animală, agent al unor pneumonii mortale în perioada 1882-1884; *Klebsiella pneumoniae* provoacă mastite la bovine, abcese la maimuțe, infecții generalizate, cu mortalitate crescută la lemurieni; la cai, sperma este contaminata cu serotipurile K_1, K_2, K_7, K_{30}, care pot produce la femele metrite, avorturi.

K. ozaenae (antigenul K_3) produce infecții ale tractului respirator, adeseori cu tendință de cronicizare;

K. rhinoscleromatis este agentul unor rinite cronice.

Sunt bacterii foarte răspândite în mediul extern (în sol, apă, pe plante) şi prezente la un procent mic de indivizi (5%) sănătoşi pe mucoasa tractului respirator superior (TRS), puțin mai frecvente în colon. Cresc foarte bine pe medii simple. *Klebsiella* produce 1% din infecțiile pulmonare, iar ocazional, ITU. *K. pneumoniae* şi *K. oxytoca* produc >10% din infecțiile nosocomiale (infecții supurative, urinare, respiratorii, biliare) apărute mai ales la imunodeprimați (neoplazici, arşi, cirotici, diabetici, bătrâni, nou-născuți preamatur). Nu sunt enteropatogene.

Tulpinile *capsulate* (infecțioase) formează colonii tipice, de 3-4 mm în diametru, mucoide (M) strălucitoare (în tuburi aşezate vertical, curg pe suprafața mediului); bulionul devine vâscos şi cultura formează un inel la suprafață.

Cel mai important reprezentant al genului este *K. pneumoniae* (bacilul Friedlander). De obicei se izolează de la pacienții cu pneumonie, dar poate infecta şi alte organe, în special tractul urinar şi rănile deschise.

K. pneumoniae fermentează lactoza, este imobilă (nu produce antigenul H); pe mediu solid tulpinile capsulate dau colonii opace şi mucoide, sunt virulente pentru om şi pentru animalele de experiență. Tulpinile necapsulate sunt nevirulente, mai mici şi translucide.

K. pneumoniae produce antigen *O* (somatic) şi antigenul *K**.

*Antigenul polizaharidic (K) al bacililor enterici a fost descris la o tulpină de *K. pneumoniae*.

Antigenul O este un polimer de unități oligozaharidice al câtorva monozaharide. Sunt cel puțin 8 tipuri de variante antigenice O. Polizaharidul capsular se obține din supernatantele acelulare prin precipitare cu Cetavlon și etanol.

La persoanele sănătoase, rezistența naturală față de *K. pneumoniae* este crescută. Progresia maladiei și prognoza sunt legate de vârstă și de factorii predispozanți. Persoanele sensibile sunt cele de vârstă medie sau vârstnicii cu alte maladii (diabet zaharat, alcoolism, maladia cronică bronhopulmonară).

Infecția pulmonară produce o infiltrare masivă cu PMN, edem amplu, formarea abcesului cu cavitare masivă.

Recuperarea spontană este dependentă de sinteza anticorpilor specifici anti-polizaharid capsular. Anticorpii anticapsulari sunt protectori și foarte eficienți pentru prevenirea infecției experimentale cu *K. pneumoniae*. Anticorpii sunt demonstrabili în ser la 1–2 săptămâni după inițierea infecției. Rolul lor esențial este cel opsonizant, ușurând ingestia agentului patogen de către fagocite.

Infecțiile recurente sunt produse de serotipuri diferite de *K. pneumoniae*.

Factorul esențial al virulenței *K. pneumoniae* este *capsula polizaharidică*, structură care permite rezistența celulei la atacul fagocitelor. Experiențele pe animale au evidențiat că tulpinile capsulate sunt mult mai virulente decât cele necapsulate.

Leziunile pulmonare sunt produse, cel mai probabil, de *endotoxina* bacteriană. Din culturile în mediul lichid ale tulpinilor virulente de *K. pneumoniae* s-a izolat un *complex extracelular toxic*, format din lipopolizaharid (LPS), polizaharidul capsular și proteine. Complexul molecular este letal după injectarea intraperitoneală la șoarece.

Gravitatea infecțiilor cu *K. pneumoniae* netratate la timp (morbiditate, sechele, letalitate) impune practicarea antibiogramei din cultura primară ori de câte ori este posibil. Diagnosticul de tulpină periculoasă și de focar infecțios de spital se bazează pe izolarea de la toți sau aproape de la toți bolnavii, a aceluiași tip. Dacă serotipul nu poate fi identificat datorită lipsei serurilor imune de diagnostic, este suficientă determinarea biotipului.

Genul *Enterobacter* cuprinde 9 specii. *Enterobacter aerogenes* nu este enteropatogen, poate produce infecții ale tractului respirator și genito-urinar, este prezent în sânge, puroi, excepțional în LCR. *Enterobacter gergoviae* este multirezistent la antibiotice, izolat din expectorații, sânge. *Enterobacter cloacae* – patogen oportunist, izolat din urină, expectorații, lichid pleural, rar din sânge și LCR.

Serratia marcescens/liquefaciens este multirezistentă la antibiotice; produce hemolizine, proteaze, siderofori, nu este enteropatogen, este patogen oportunist, apare în infecții urinare sau respiratorii, diferite supurații, căi biliare, septicemii.

7.1.6. Grupul *Proteus Morganella Providencia* reunește specii TDA^+, FAD^+. Structurile implicate in virulență sunt reprezentate de *proteine de membrană externă* (OMP) implicate în aderență, mitogene pentru limfocitele B; *fimbrii,* cu rol în aderența la țesutul epitelial: MR/P, MR/K-*like*, prin care aderă la capsula glomerulară; ATF (*ambient temperature fimbriae*), UCA (*uroepithelial cell adhesion*) – fimbriile de tip 1 similare celor de *E. coli* și fimbrii de tip P; *flageli* cu rol în ascensiunea infecțiilor urinare; *urează*, *Ag H* foarte variabil; *IgA-proteaze*; *TDA,* care generează proteine cu α-cetoacizi ce acționează ca agenți chelatori de Fe.

Caracteristici antigenice:

Antigenele de grup au semnificație practică în reacția de serotipizare.

Tulpinile de *Proteus* „O" (Ox19, Ox2, Oxy) sunt utilizate în reacția Weil-Felix pentru diagnosticul infecțiilor rickettsiene. Capsula conține acizi uronici, acid piruvic, grupări fosfat cu caracter acid, ce pot lega Mg^{2+} și favorizează formarea calculilor renali,

Patogeneză: infecții minore (urează = factor de patogenitate), plăgi suprainfectate, septicemii, meningite purulente neonatale.

g. Proteus

Genul *Proteus* este larg răspândit în mediul înconjurător și face parte din microbiota normală a tractului gastrointestinal uman. Deși *E. coli* produce cele mai multe cazuri de cistite necomplicate, pielonefrite și prostatite, speciile de *Proteus* reprezintă a treia cauză a acestor infecții, în special a celor nosocomiale. *P. vulgaris* produce infecții pulmonare, ITU, bacteriemie numai atunci când dobândește o localizare extraintestinală. Sub acțiunea *ureazei* pe care o produce, *P. vulgaris* eliberează NH_4 și

alcalinizează ureea, fără posibilitatea acidifierii, favorizând formarea calculilor. Este un agent patogen nosocomial important. Specia *P. mirabilis* determină infecții nosocomiale și este frecvent izolată în laboratoarele de microbiologie clinică.

Unele studii atribuie potențial enteropatogen speciilor de *Proteus mirabilis* și *P. penneri*.

P. mirabilis este agentul unor bacteriemii, osteomielite, precum și al meningoencefalitei neonatale. S-a dovedit implicarea *P. penneri* într-un caz de bacteriemie concomitent cu un abces subcutanat femural la un pacient neutropenic cu leucemie limfocitară acută și într-o urosepticemie nosocomială la un pacient cu diabet.

Studii recente sugerează ca *Proteus mirabilis* poate fi implicat în etiologia unor artrite reumatoide (la pacienții cu artrite reumatoide s-a identificat frecvent infecția urinară cu densitate mare a celulelor de *Proteus*).

Tulpinile *P. mirabilis* indol-negative sunt, în general, mai sensibile la antibiotice decât cele indol-pozitive (*P. vulgaris, P. penneri* și *P. hauseri*).

Chow (1979) raportează o epidemie de *P. mirabilis* cu tulpini rezistente la ampicilină, cefalotin, tetraciclină, cloramfenicol, carbenicilină, colistin, trimetoprim-sulfametoxazole, streptomicină și aminoglicozide.

Tulpini clonale de *P. mirabilis* rezistente la gentamicină și clorhexidină (un antiseptic utilizat și ca dezinfectant al mâinilor, dar și în calitate de conservant), ca și la alți agenți antimicrobieni, sunt frecvent izolate din cazuri de infecții urinare, de obicei diseminate de la pacienți cateterizați. *P. mirabilis* sensibil la tetraciclină a fost izolat din bacteriemii și meningite la nou-născuți.

P. penneri este, în general, mai rezistent la penicilină decât *P. vulgaris*, iar în privința profilului său de sensibilitate se aseamănă mai mult cu *Morganella morganii,* decât cu *P. vulgaris.* Această specie este, în general, sensibilă la cefotaxim, la cefalosporine cu spectru larg (ceftriaxon, ceftizoxim și ceftazidina), cefepime, aztreonam, aminoglicozide, ciprofloxacin, tazobactam și imipenem, și poate fi rezistentă la cefazolin, cefprozil, cefuroxim, cefamandol, cefdinir, cefoperazon, loracarbef, ampicilină și ureidopeniciline.

Genul *Providencia*

Providencia sp. și *Citrobacter* sp., membri ai microbiotei normale, produc ITU și chiar septicemii.

Semnificație clinică. Speciile genului *Providencia* au fost izolate din urină, spută, sânge, exudate faringiene și din plăgi. *Providencia heimbachae* și *Providencia rustigianii* au fost izolate de la pinguini.

P. stuartii a fost identificată ca agent patogen pentru pacienții cu catetere urinare din sanatorii. 21% dintre infecțiile tractului urinar se datorează fie *P. mirabilis*, fie *P. stuartii*. *P. rettgeri* este implicată în infecțiile nosocomiale, dar cu o incidență mult mai mică.

Teoretic, toate speciile de *Morganella, Providencia,* ca și *Proteus vulgaris, Proteus penneri* sunt capabile să producă β-lactamaze inductibile care hidrolizează penicilinele și cefalosporinele. Din aceste motive sensibilitatea tulpinilor de *Providencia* izolate din clinică trebuie să fie permanent monitorizată.

Genul *Morganella*

M. morganii este un patogen oportunist, un agent etiologic al diareii călătorilor, la pacienți cu afecțiuni gastrointestinale, septicemii neonatale, abcese cerebrale, tubo-ovariene, corioamniotite, piomiozite și meningite la indivizi imunocompromiși.

Ca și *Providencia, Morganella* produce β-lactamaze și este în general rezistentă la cefalosporine și ampicilină (fig. 156).

Testele de antibiosensibilitate automată sunt inadecvate pentru caracterizarea mecanismelor de rezistență bacteriană, putând să furnizeze rezultate de sensibilitate falsă. Testarea cu aztreonam poate indica eronat rezistența deoarece alungirea celulelor chiar înainte de liză poate fi interpretată de aparat ca fiind rezultatul creșterii.

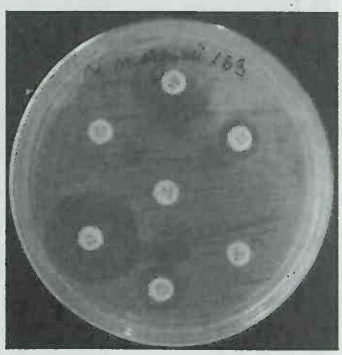


Fig. 156. Tulpină de *Morganella morgani* producătoare de ESBL, se remarcă sinergismul de acțiune între β-lactamice (peniciline, cefalosporine) și acidul clavulanic.

7.1.7. Genul *Edwardsiella* – specia *tarda* nu este comensală a tractului digestiv (rezervorul este reprezentat de reptile şi peşti), prezintă caractere biochimice similare cu *Salmonella*, este producătoare de H_2S, dar produce indol şi are profil diferit de fermentare a zaharurilor. În zonele tropicale, este enteropatogenă şi izolată în mod excepţional din sânge, urină, LCR la imunodeprimaţi.

7.1.8. Genul *Levinea (Citrobacter) malonatica* / (C.) *amalonatica (us)* reuneşte tulpini diferite de *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Kluyvera* Cit^+, LDC^-, lactoză-negative sau lactoză pozitive tardiv, patogene oportuniste, care pot produce produce septicemii, meningite neonatale cu rată mare de mortalitate, infecţii urinare şi bronhopulmonare. În pediatrie, *L. amalonatica* provoacă diaree la nou-născuţi. Uneori prezintă asemănări antigenice cu *Shigella*, dar nu sunt enteroinvazive.

7.1.9. Genul *Kluyvera* este o specie rareori izolată în clinică, mobilă, $ONPG^+$, VP^-, Ind^+. La om a fost izolată din expectoraţii, urină, bilă, scaune, sânge, puroi, fiind considerată patogen oportunist.

7.1.10. Genul *Buttiauxella* este asemănătoare cu *Kluyvera*, dar diferită genetic, indol-, LDC-, Sac-. Patogenitatea este similară cu cea de la *Kluyvera.*

Testarea sensibilităţii la antibiotice a enterobacteriilor şi raportarea rezultatelor trebuie să aibă în vedere multiplele fenotipuri de rezistenţă naturală şi dobândită, prezente la enterobacterii, mai ales la antibioticele β-lactamice. Raportarea rezultatelor antibiogramei trebuie să ţină cont de asemenea şi de originea produsului patologic. Astfel, în cazul izolatelor fecale de *Salmonella* sp. şi *Shigella* sp., se raportează numai ampicilina, o fluorochinolonă şi biseptolul, iar în cazul izolatelor extraintestinale de *Salmonella* sp., se adaugă o cefalosporină de generaţia a treia şi cloramfenicolul. Pentru *Salmonella* şi *Shigella* nu se raportează rezultatele pentru aminoglicozide, acestea nefiind eficiente *in vivo,* chiar dacă tulpinile manifestă sensibilitate *in vitro* la aceşti agenţi. Pentru izolatele din LCR se raportează numai cefalosporinele injectabile (ceftriaxona, cefotaximul) şi nu cele orale (cefazolin, cefalotin) (CLSI, 2009). Tulpinile de *Klebsiella sp., E coli* şi *Proteus mirabilis* producătoare de β-lactamaze de spectru larg (ESBL) (157–158) şi confirmate prin testele recomandate de CLSI trebuie raportate rezistente la peniciline, cefalosporine, aztreonam, indiferent de rezultatul testării *in vitro* (CLSI, 2009).

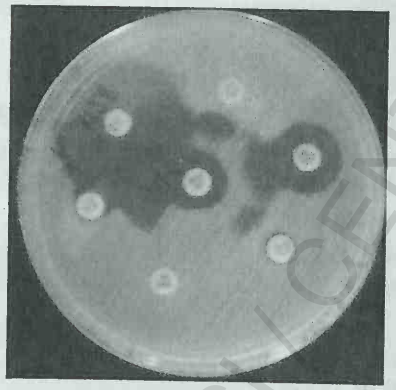


Fig. 157. Tulpină de *Klebsiella pneumoniae* producătoare de ESBL, se remarcă sinergismul de acţiune între beta-lactamice (peniciline, cefalosporine) şi acidul clavulanic.

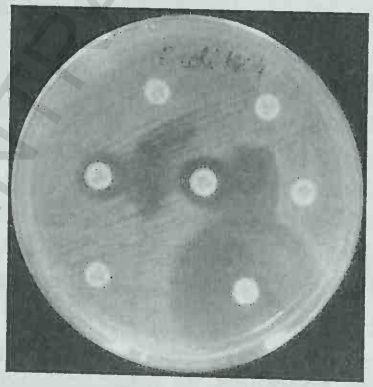


*Fig. 158.*Tulpină de *E. coli* producătoare de ESBL, se remarcă sinergismul de acţiune între β-lactamice (peniciline, cefalosporine) şi acidul clavulanic.

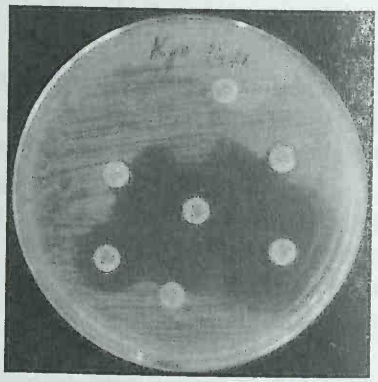


Fig. 159. Tulpină de *K. pneumoniae* producătoare de ESBL. Se remarcă sinergismul de acţiune între β-lactamice (peniciline, cefalosporine) şi acidul clavulanic.

În unele instituţii medicale se recomandă *screening*-ul tulpinilor producătoare de ESBL, la cele izolate din infecţii urinare. Tulpinile de *Citrobacter sp., Serratia* sp. şi *Enterobacter* sp. pot dezvolta rapid rezistenţă la cefalosporinele de generaţia a treia chiar în timpul tratamentului, prin derepresarea genelor pentru enzimele AmpC cromosomale, de aceea se recomandă testarea izolatelor succesive de la acelaşi pacient.

Spre deosebire de ESBL, care sunt enzime sensibile la acidul clavulanic, enzimele AmpC, codificate plasmidial, care conferă același fenotip de rezistență la β-lactamice, nu sunt inhibate de acidul clavulanic: când cele două enzime sunt exprimate simultan, sinergismul între acidul clavulanic și cefalsoporinele de generația a treia este mascat (fig. 160).

Deși nu există încă metode standardizate de detectare fenotipică, totuși tulpinile producătoare de AmpC, spre deosebire de cele producătoare de ESBL, manifestă în general rezistență la cefamicine (cefotetan și cefoxitin).

Fig. 160. Tulpină de *E. coli* probabil simultan producătoare de ESBL și AmpC, care maschează sinergismul cu acid clavulanic.

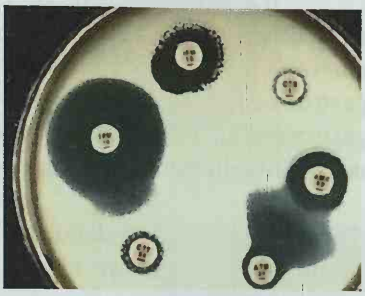


Fig. 161. Tulpină de *Klebsiella pneumoniae* producătoare simultan de ESBL (SHV-12) și carbapenemază (IMP-4) (Poirell și Nordmann, 2004).

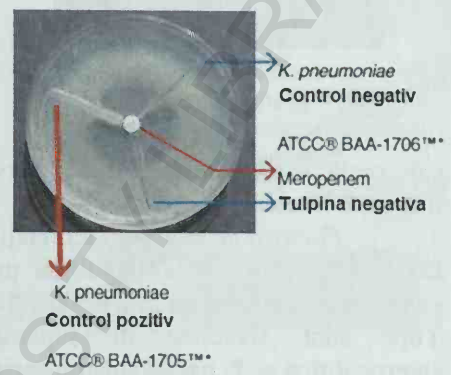


Fig. 162. Testul Hodge modificat (CLSI, 2009). Tulpinile producătoare de carbapenemază generează apariția unei zone de inhibiție cu aspect de treflă.

Pentru unele specii de enterobacterii, s-au constatat rezultate de falsă sensibilitate la anumite cefalosporine, care prin urmare, nu se raportează la speciile respective (de exemplu, *Providencia* la cefprozil, *Morganella* la cefixim, *Citrobacter, Providencia, Enterobacter* la cefnidir și lorocarbef).

Enterobacteriaceele rezistente la cefalosporinele de generația a treia cu valori CMI ridicate sau zone de inhibiție a creșterii reduse la carbapenemi, pot fi producătoare de carbapenemaze, chiar dacă valorile se află la limita superioară a sensibilității (fig. 160–162).

În acest caz se recomandă *screening*-ul producerii de carbapenemază prin testul Hodge modificat sau alte teste bazate pe stabilirea valorii CMI sau *cut-off. Proteus sp., Providencia sp., Morganella sp.* pot prezenta rezistență la carbapenemi prin mecanism neenzimatic, așadar testele bazate de stabilirea valorii CMI la imipenem nu sunt adecvate pentru revelarea producerii de carbapenemază.

În cazul evidențierii unei tulpini producătoare de carbapenemază, stabilirea valorii CMI la carbapemeni este obligatorie, aceasta fiind raportată fără interpretare. Clinicianul va fi informat privitor la mecanismul de rezistență pentru a se putea considera un tratament alternativ.

7.1.11. Genul *Yersinia*

Yersinia este o bacterie Gram negativă, cu morfologie de bacili pleomorfi. Celulele se pot colora bipolar. Este microaerofilă, facultativ anaerobă. Testul catalazei este pozitiv, iar al oxidazei negativ.

Gazdele naturale sunt animalele, dar pot produce maladii infecțioase umane: *Y. pestis* – agentul plăgii umane; *Y. pseudotuberculosis; Y. enterocolitica* – agentul unei boli diareice la om.

Y. pestis este un bacil Gram negativ, imobil (fig. 163).

Este facultativ anaerobă, creșterea fiind mai rapidă pe medii suplimentate cu sânge (fig. 164) sau cu alte lichide biologice, la 30°C.

Fig. 163. Secțiune printr-un ganglion infectat cu *Y. pestis*. Celulele bacteriene au aspect caracteristic de ac de siguranță, colorație Wayson (http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/plague/wayson).

BCU CENTRAL UNIVERSITARA

Fig. 164. Morfologia coloniilor de *Y. pestis* pe geloză sânge (http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/zoonoses).

Y. pestis este agentul plăgii (ciuma bubonică), infectează rozătoarele şi poate fi transferată la om prin înţepătura puricelui. Pandemiile de ciumă bubonică au marcat istoria omenirii prin milioanele de victime (în Ţara Românească, cea mai mare epidemie de ciumă a fost cea din timpul domniei lui Caragea, din 1813–1814, care a ucis jumătate din populaţia Bucureştiului).

Y. enterocolitica şi *Y. pseudotuberculosis* produc simptome patologice asemănătoare la rozătoare. La om *Y. enterocolitica* produce o diversitate de manifestări gastrointestinale, iar *Y. pseudotuberculosis* poate produce o gastroenterită autolimitată. Ambele pătrund în organism pe cale orală şi traversează bariera intestinală prin celulele M care acoperă foliculii limfoizi pe toată lungimea intestinului.

Factorii de virulenţă secretaţi de *Yersinia* spp. au fost denumiţi *Yops* (*Y*ersinia *o*uter *p*roteins). Denumirea vine de la faptul că proteinele s-au identificat iniţial în membrana externă la *Y. enterocolitica*. Ulterior s-a evidenţiat că proteinele Yops sunt secretate în supernatantul de *Y. enterocolitica* şi *Y. pseudotuberculosis*. Prezenţa lor în supernatant nu se datorează lizei celulare şi nici formării veziculelor membranare.

Efectul antifagocitar este mediat de sistemul de secreţie de tip III şi necesită o proteină cu activitate tirozin-fosfatazică, denumită *Yop H* (*Y*ersinia *o*uter *p*rotein). După contactul bacteriei cu macrofagul, sistemul de secreţie de tip III se activează şi proteinele de virulenţă Yop P/J, H, E, O şi T sunt *injectate* în citosolul celulei ţintă, sistemul de secreţie de tip III fiind numit datorită acestui efect, injectisom (fig. 165). Efectul Yop H şi Yop P/J este o defosforilare rapidă a proteinelor care poartă resturi de tirozină fosforilate în citosolul macrofagului, a căror activitate ar fi necesară pentru fagocitoză (fig. 166). *Yop H* este cea mai activă tirozin-fosfatază cunoscută şi are omologie a secvenţei de aminoacizi în jumătatea C-terminală, cu tirozin-fosfataza eucariotelor. Proteina conferă capacitatea *Y. pseudotuberculosis* de a rezista fagocitozei de către macrofagele cultivate.

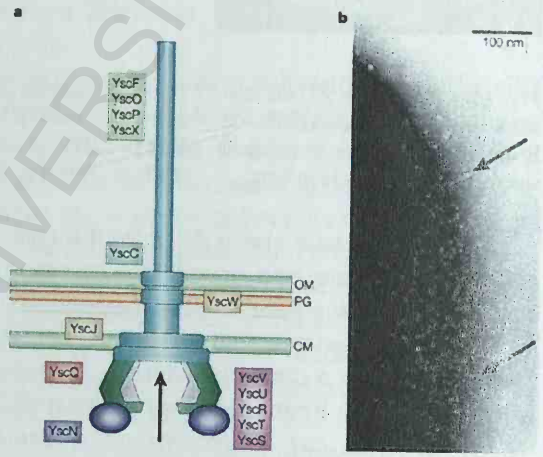


Fig. 165. (a) Reprezentarea schematică a structurii injectisomului la *Yersinia*. (b) Săgeţile indică acestei structuri evidenţiată prin metoda coloraţiei negative la microscopului electric (Cornelis, 2002)

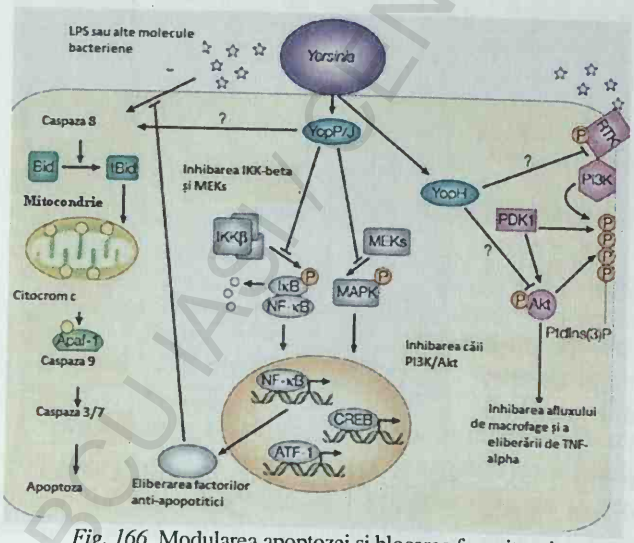


Fig. 166. Modularea apoptozei şi blocarea fagocitozei de către speciile de *Yersinia* (Cornelis, 2002).

Yersinia, inhibitoare a procesului de fagocitoză, produce şi efecte citotoxice în celulele epiteliale *in vitro*. Efectul citotoxic este mediat de alte proteine bacteriene, cea mai importantă fiind *Yop E*, care produce modificări ample ale citoscheletului, care culminează cu ruperea microfilamentelor de actină (fig. 167, 168).

Proteina *Yop E* are efect citotoxic puternic după ce celula de *Yersinia* aderă la suprafaţa celulei eucariote. Citotoxicitatea nu se observă înainte de aderenţă şi nu este mediată de supernatantul care conţine pro-teinele Yops secretate. Înainte de contactul celular, Yop E nu este secretată în supernatant.

BCU IAŞI CENTRUL UNIVERSITAR

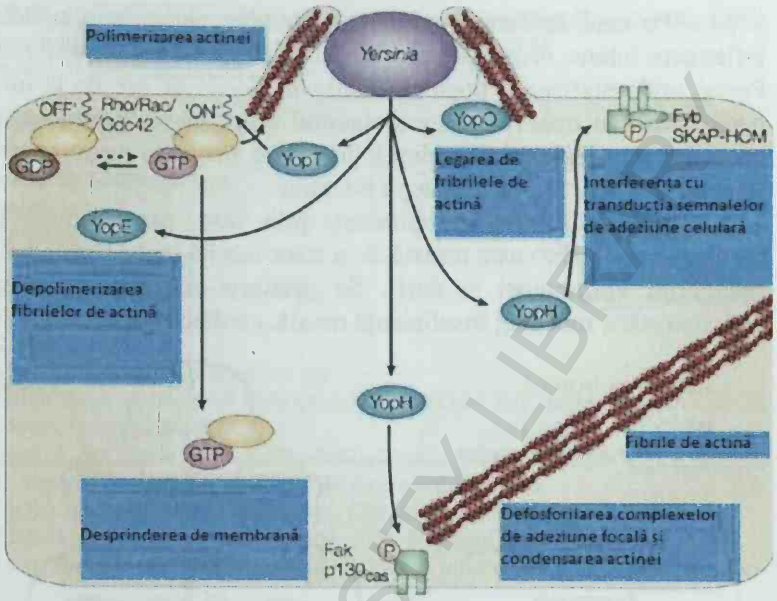


Fig. 167. Depolimerizarea filamentelor de actină de către proteinele Yop (Cornelis, 2002).

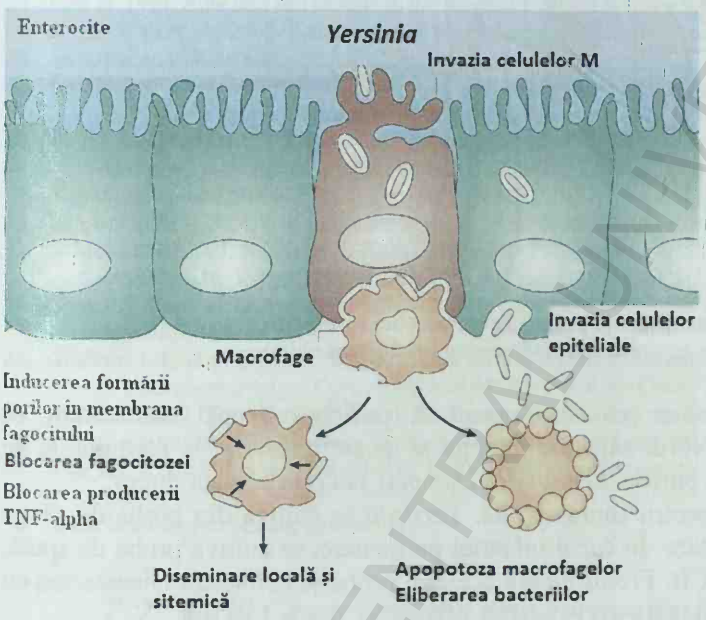


Fig. 168. Invazia barierei intestinale de către speciile de *Yersinia* (Sansonetti, 2004).

Yersinia secretă şi translocă proteinele într-o manieră polarizată: factorii secretați sunt translocați direct în citosolul celulei țintă, fără să treacă în mediul extracelular şi nu sunt secretați în mediul de cultură tisulară. Genele codificatoare ale proteinelor translocate sunt represate până la întâlnirea cu celula țintă. La contactul cu celula țintă, canalul de secreție se deschide.

Patogeneză. Y. pestis este transmisă de artropode. Puricele se hrăneşte hematofag pe un rozător infectat cu *Y. pestis*. Celulele bacteriene se multiplică în intestinul puricelui, secretă coagulază, enzimă care produce coagularea sângelui ingerat. Cheagul blochează segmentul superior al tubului digestiv (proventriculul) şi tranzitul sângelui aspirat, contaminat cu *Y pestis*, este blocat. Sângele refulează din tractul digestiv al puricelui în leziunea tegumentară produsă de înțepătură.

Toate cele 3 specii patogene de *Yersinia* rezistă factorilor celulari nespecifici de apărare, pentru că inhibă înglobarea de către fagocitele profesioniste. În consecință, celule de *Yersinia* sunt localizate în spațiul extracelular. Celulele bacteriene inoculate sunt fagocitate de PMNN şi monocite. PMNN sunt echipate mai bine pentru a liza *Y. pestis*, dar agentul infecțios rezistă în monocite şi se multiplică. La 37°C, bacteria produce o proteină antifagocitară şi astfel rezistă atacului fagocitelor. Toate cele 3 specii (*Y. pestis*, *Y enterocolitica* şi *Y. pseudotuberculosis*) au tropism marcat pentru țesutul limfoid.

USMF "NICOLAE TESTEMIȚANU" LIBRARY

Pe cale limfatică, celulele bacteriene ajung în ganglionii limfatici, unde induc un proces inflamator intens, urmat de necroză ganglionară. În organismul rozătoarelor *Yersinia* persistă în plăcile Peyer, unde realizează populații dense în 12–24 de ore de la infecție. Invazia se poate opri la nivel ganglionar sau trece în sânge şi agentul infecțios se disemineză sistemic, cu leziuni hemoragice şi necrotice în viscere (ficat, splină), uneori cu afectarea meningelui şi a plămânilor. Moartea animalelor infectate survine în 3–4 zile după infecție.

Aerosolii infectați, eliminați prin tuse, produc după inhalare plaga pulmonară primară. Incubarea (2–7 zile) este urmată de o stare febrilă înaltă, limfadenopatie axilară şi inguinală dureroasă (ganglioni voluminoşi şi duri). Se produce coagularea intravasculară diseminată, hipotensiune, alterarea stării mentale, insuficiență renală, cardiacă (fig. 169).

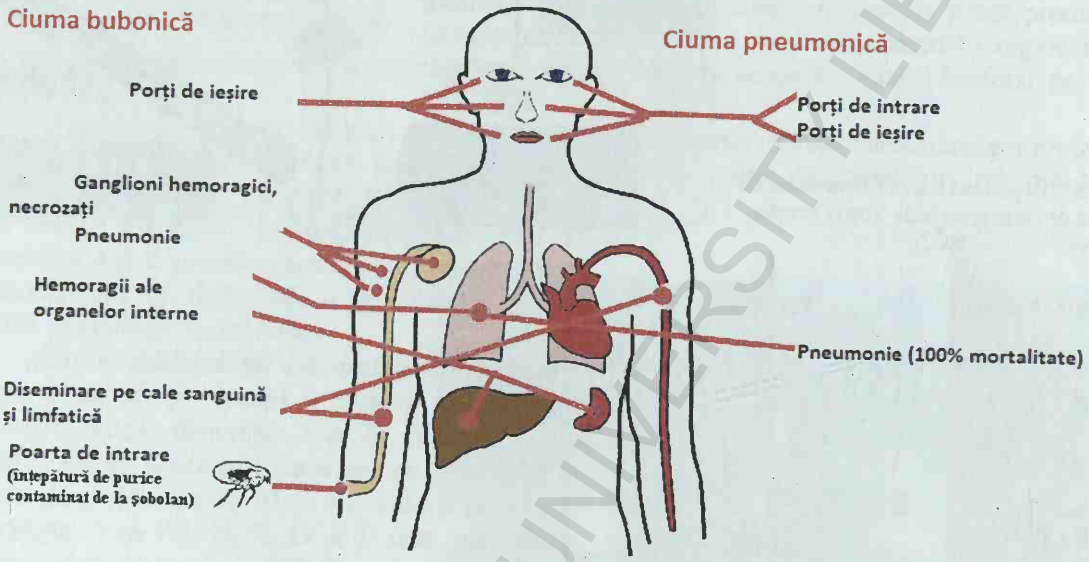


Fig. 169. Localizarea manifestărilor patologice ale infecției *cu Y. pestis* la om (http://people.uwec.edu/piercech/bio/Pnuemonic%20Plague.htm).

Infecția cu agentul plăgii bubonice se suspectează la pacienții expuşi contactului cu rozătoarele în ariile endemice. Din rezervorul sălbatic, infecția se poate transmite la rozătoarele de casă şi la pisică. Infecția este transmisă de purice (*Xenopsylla cheopis*) sau prin contact direct.

Diagnosticul rapid este esențial pentru supraviețuire. *Yersinia* se cultivă din proba de sânge sau din aspiratul ganglionilor cu volum mare. În cazul infecției pulmonare, se cultivă proba de spută, iar din cazurile de meningită, se cultivă LCR. Frotiurile din aceleaşi probe se colorează Giemsa sau cu anticorpi specifici marcați cu fluorocrom.

Infecțiile netratate dau o mortalitate de 50%, iar cele pulmonare, de 100%. *Yersinia* este sensibilă la streptomicină (şi la asociația streptomicină – tetraciclină).

Bibliografie

1. Clinical Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptiblity test. M2A10, vol. 29, no. 1.
2. Clinical Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptiblity test. M 100, vol. 29, no. 1.
3. Coburn, B., Sekirov I., Finalay B. B. 2007. Type III Secretion System and Disease – Clin. Micr. Reviews. 20(4): 535–549.
4. Cornelis G. R. 2002. The Yersinia Ysc–Yop 'Type III' weaponry. Nature Reviews Molecular Cell Biology 3, 742–754.
5. Croxen M., Finlay B. B. 2009. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. Nature Reviews Microbiology, advance online publication, Published online 7 December 2009 | doi:10.1038/nrmicro2265
6. Darwin K. H., Miller Virginia L. 1999. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa – Clin. Micr. Rev.(12) 3: 405–428.
7. Goldberg, M. B. 2001. Actin-Based Motility of Intracellular Microbial Pathogens. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65 (4): 595–626.

BUCUREŞTI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8. Gunnar N. Schroeder and Hubert Hilbi*. 2008. Molecular Pathogenesis of Shigella spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. Clinical Microbiology Reviews. 21 (1): 134–156
9. Halle T. L. 1991. Genetic basis of Virulence in *Shigella* species .Microbiol. Rev. 55(1): 143–190.
10. http://emu.arsusd
11. http://microblog.me.uk/wp-content/uploads/salmonella_BGA.jpg
12. http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/zoonoses.
13. http://people.uwec.edu/piercech/bio/Pnuemonic%20Plague.htm
14. http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/plague/wayson.
15. http://www.ecl-lab.ca/en/ecoli/pathogenesis.asp
16. http://www.mikrobiyoloji.org/_0.jpg)
17. http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n5/images/nrmicro1391-f3.jpg
18. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/ Bpathogenesis
19. http://www.necker.fr/u1002/html/team2.html
20. http://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/Images/EPEC-pedestal-on-intestinal.jpg
21. Iglewski B. H., Clark VL (eds): Molecular Basis of Bacterial Pathogenesis. Vol. XI of The Bacteria: A Treatise on Structure and Function. Academic Press, Orlando, FL, 1990
22. Brooks GENUL F., Caroll K. C., Butel J. S., Morse S. A. eds. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition Jawetz, Melnick şi Adelberg. http:// www.accessmedicine.com
23. Johnson A. GENUL 1994. Molecular Adjuvants and Immunomodulators . Clin. Microbiol. Rev. 7(3): 277.
24. Johnson J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection – Clin. Microbiol. Rev. January 4: 80–128 *D.*
25. Jones B. D., Falkow S. 1996. Salmonelosis. Host Immune Responses and Bacterial Virulence Determinants .Annu. Rev. Immunol. 14: 533–561.
26. Law D. 1994. Adhesion and its Role in the Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli.* Clin. Microbiol. Rev. 7:153–173.
27. Lu, L. Walker, A. 2008. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium.
28. med.mui.ac.ir/slide/bactrio/bactrio3.html
29. Philippe J. Sansonetti. 2001. Microbes and Microbial Toxins:Paradigms for Microbial-Mucosal Interactions III. Shigellosis: from symptoms to molecular pathogenesis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 280: G319–G323.
30. Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., Nordmann P. 2004. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 48 (1): 15–22
31. s2.hubimg.com/u/1366057_f520.jpg
32. Sansonetti P. J. 2004.War and peace at mucosal surfaces. Nature Reviews Immunology 4, 953-
33. Schroeder GENUL N., Hilbi H. 2008. Molecular Pathogenesis of Shigella spp. Controling Host Cell Signaling Invasion and Death by Type III Secretion – Clin. Microbiol. Reviews 2(1): 134–156.
34. Shin, J.S., Gao, Z. & Abraham, S. N. 2000. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells., *Science. 289*: 785–788.
35. Sinclair, J. F. & O'Brien, A. D. 2002. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-g of enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7. J. Biol. Chem. 277:2876–2885.
36. Todar K. 2009. The Microbial World. Lectures in Microbiology by Kenneth Todar PhD University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology. *Salmonella* and Salmonellosis. textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/
37. Van der Wounde M. W. , Baumler A. J. 2004. Phase and Antigenic Variation in Bacteria. Clinical Microbiol. Rev. 17: 581–611.
38. www.healthhype.com/tag/salmonella)

7.2. Bacili Gram negativi non-fermentativi oportunişti

Pe lângă enterobacterii (numite şi bacili BGF), există o serie de bacili Gram negativi non-fermentativi (BGNF) strict aerobi (care nu fermentează glucoza şi alte zaharuri, dar le degradează pe cale oxidativă) cu rol important în patologia umană (cca. 20 de genuri şi câteva zeci de specii) care adeseori sunt implicate în etiologia infecţiilor oportuniste şi nosocomiale. Reprezentanţii grupului, spre deosebire de enterobacterii, sunt larg răspândiţi în sol şi ape, la animale şi pe plante, în special în habitatele umede.

Morfologia variază de la bacili Gram negativi scurţi şi groşi (trapezoizi) (*Acinetobacter*) la bacili lungi şi fini ca *Ps. aeruginosa*, imobili sau mobili.

BGNF au multiple capacităţi nutriţionale: metabolizează substraturi foarte diverse, ceea ce le permite creşterea pe medii foarte selective (Drigalski, cetrimid) sau minimale (apă, glucoză $(NH_4)_2$, – SO_4, oligoelemente). Pot supravieţui în apă bidistilată, soluţie de heparină, soluţie de substanţe antiseptice şi dezinfectante. Pot fi transmise clonal prin intermediul aparaturii medicale. Virulenţa este mediată de adezine, toxine, capacitatea de a forma biofilme mai ales, de multirezistenţa naturală sau dobândită la numeroase antibiotice, ceea ce explică frecvenţa tot mai mare a infecţiilor nosocomiale (infecţii din mediul spitalicesc) cu *Pseudomonas*. Familia *Pseudomonadaceae* cuprinde genul

CONSTANTA UNIVERSITY LIBRARY

Pseudomonas cu 256 de specii, împărțite în 4 grupe metabolice și genul *Xanthomonas*, care alături de *Pseudomonas* formează grupul *pseudomonadelor*. Membrii grupului sunt cunoscuți mai mult ca patogeni ai plantelor decât ai animalelor, dar trei specii de *Pseudomonas* sunt patogene pentru om.

Cea mai importantă specie este *Ps. aeruginosa*, patogen oportunist care determină infecții, uneori fatale, la persoanele cu deficiențe ale sistemelor de apărare, la care se adaugă *Alcaligenes xylosoxydans*, *Burkholderia cepacia*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas fluorescens*, *Ralstonia pickettii*, *Acinobacter baumannii Stenotrophomonas maltophilia* și genul *Xanthomonas*.

7.2.1. Pseudomonas aeruginosa

Genul *Pseudomonas* este o bacterie ubicuitară, în sol, pe suprafața materiei vegetale, în apele dulci și marine. Numeroase tulpini se pot dezvolta la temperaturi scăzute (psichrofilie) și contaminează produsele alimentare sau farmaceutice conservate la rece. Uneori se poate izola din microbiota intestinală a omului și animalelor.

Izolatele de *Ps. aeruginosa* pot produce trei tipuri de colonii. Izolatele naturale din sol sau apă produc colonii mici de tip R. Izolatele clinice, în general, produc una dintre cele două tipuri de colonii netede (tip S): colonii cu aspect de "ou ochi" (fig. 170), mari, netede, cu marginile aplatizate și cu profil ridicat, sau colonii cu aspect mucoid, izolate de obicei din secrețiile tractului respirator și urinar, aspect datorat producției de *alginat*.

Ps. aeruginosa crește pe o mare diversitate de medii și produce un miros caracteristic de flori de tei. Unele tulpini lizează hematiile. Coloniile sunt netede (S), de culoare verzui-fluorescentă, datorită *piocianinei*[*], un pigment ce difuzează în agar (fig. 170).

[*] Piocianina (de la 'piocianeus') se traduce prin 'puroi albastru' caracteristic infecțiilor supurative cauzate de *Ps. aeruginosa*.

Unele tulpini produc *pioverdina*, pigment fluorescent ce colorează agarul într-o nuanță verzuie (fig. 171), *piorubina* (roșu închis) sau *piomelanina* (pigment negru). *Pioverdina* este produsă în cantitate mare în medii private de Fe.

Fig. 170. Apectul de "ou ochi" al coloniilor de *Ps. aeruginosa* pe geloză sânge (http://lib.jiangnan.edu.cn/ASM/123-4.jpg).

Fig. 171. Culturi pigmentate de *Ps. aeruginosa*, crescute pe mediu Müller Hinton.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ps. aeruginosa este agentul *patogen oportunist* major al grupului. Este foarte frecvent în mediile umede din spitale şi colonizează ca saprobiont organismul uman, dar devine patogen pentru indivizii imunocompromişi, la care poate produce infecţii ale tractului urinar, ale aparatului respirator, ale ţesutului conjuctiv, dermatite, bacteriemii şi o varietate de infecţii sistemice, mai ales la pacienţii cu arsuri severe extinse, cu fibroză chistică sau neoplazici şi la pacienţii SIDA. *Ps. aeruginosa* poate fi de asemenea ocazional fitopatogen.

Ps. aeruginosa este cel mai important agent infecţios nosocomial.

În ape *Pseudomonas* creşte sub formă de biofilme sau de celule libere.

Ps. aeruginosa prezintă o mare variabilitate metabolică. Nu necesită factori de creştere, dar poate metaboliza peste 30 de compuşi organici (fig. 172).

Fig. 172. Galerie de teste biochimice Api 20 NE cu profil de *Ps. aeruginosa* (în a doua parte a galeriei se testează capacitatea bacteriei de a utiliza diferite substraturi ca sursă de C).

Ps. aeruginosa poate fi izolat din sol şi apă, mai ales din mediile de îmbogăţire pentru bacteriile denitrificatoare. Deşi bacteria este aerobă şi niciodată fermentativă, creşte în absenţa O_2, numai dacă NO_3 este prezent în mediu, având rol de acceptor de electroni la capătul catenei de respiraţie. *Ps. aeruginosa* este deseori izolat din apa distilată, dovadă că are necesităţi nutritive foarte simple. Temperatura optimă de creştere este 37°C, însă se poate dezvolta şi la 42°C. Toleranţa la factorii fizici, inclusiv la temperatură, contribuie la succesul său ca patogen oportunist şi mai ales, nosocomial. *Ps. aeruginosa* manifestă totuşi o predilecţie pentru dezvoltarea în medii umede, o reflectare a existenţei sale naturale în sol şi apă.

Pentru identificarea *Ps. aeruginosa* se analizează probe din leziunile tegumentare, puroi, urină, sânge, spută, LCR. Pe frotiu se observă bacili Gram negativi; coloniile sunt adeseori, pigmentate; capacitatea de creştere la 42°C; testul oxidazei este pozitiv; nu fermentează lactoza (fig. 173).

Fig. 173. Cultură lactozo-negativă de *Ps. aeruginosa* pe mediu MacConkey şi CLED.

Gravitatea infecţiilor cu *Pseudomonas* rezidă în absenţa vaccinului şi în *multirezistenţa* la antibiotice, atât naturală, cât şi dobândită. *Rezistenţa naturală* este datorată mai multor factori: *bariera impermeabilă* oferită de membrana externă de LPS; *creşterea în biofilme* care conferă celulelor protecţie faţă de concentraţiile terapeutice de antibiotice; prezenţa *plasmidelor de rezistenţă (R) la antibiotice* şi a *factorilor de transfer al plasmidelor de rezistenţă* (FTR) prin procesul de tranducţie şi conjugare. *Rezistenţa dobândită* se datorează presiunii selective a antibioticelor administrate în clinică. Inutilitatea antibioticelor în tratamentul infecţiilor cu *Pseudomonas* este cel mai dramatic evidenţiată în cazul pacienţilor cu fibroză chistică, infectaţi de obicei cu tulpini multirezistente la toate antibioticele disponibile şi imposibil de tratat.

Pseudomonas este uneori rezident al microbiotei normale umane, deşi proporţia indivizilor sănătoşi colonizaţi cu *Pseudomonas* în afara spitalului este scăzută (rata estimată fiind de 0–24%, în funcţie de situl anatomic). Sursa agentului patogen şi modul de transmitere a *Ps. aeruginosa* sunt deseori incerte datorită caracterului său ubicuitar. *Ps. aeruginosa* este în primul rând un patogen nosocomial.

Patogeneză. Pentru un patogen oportunist ca *Ps. aeruginosa* procesul îmbolnăvirii începe cu alterarea sau evitarea sistemului de apărare a gazdei. Patogeneza infecțiilor cu *Pseudomonas* este multifactorială, fiind sugerată de numărul mare și de spectrul larg al factorilor de virulență, reflectați în gama largă de boli produse de *Ps. aeruginosa*: septicemii, infecții ale tractului urinar, pneumonii și infecții pulmonare cronice, endocardite, dermatite și osteocondrite (Kiska și Gilligan, 2003).

Factorii de virulență sunt numeroși (fig. 174), iar activitățile lor în organismul gazdei sunt redate în tabelul 19.

Tabelul 19.

Activitățile biologice ale factorilor de virulență prezenți la *Ps. aeruginosa*

Factor de virulență	Activitate biologică
Exopolizaharide mucoide (alginat)	Aderență la epiteliu Barieră împotriva fagocitelor și antibioticelor Inhibă legarea anticorpilor și a complementului
Proteaze	Lezarea țesutului Slăbirea joncțiunilor celulelor epiteliale Degradarea fibronectinei Clivarea anticorpilor Inactivarea α1-antitripsinei, componentelor complementului și citokinelor Clivarea receptorilor C3b de pe suprafața neutrofilelor Stimulează secreția de mucus
Exotoxina A	Citotoxică prin inhibarea sintezei proteinelor Toxică pentru macrofage Mitogen pentru celulele T Inhibă proliferarea granulocitelor și macrofagelor
Lipopolizaharide	Determinant antigenic pe suprafața celulei Proprietăți endotoxice mai slabe decât LPS a altor specii Gram negative
Pigementi: piocianina, 1-hidroxifenazina, pioverdina	Inhibă mișcarea cililor Toxici pentru alte specii bacteriene și celulele umane Stimulează metabolismul oxidativ al neutrofilelor Inhibă proliferarea limfocitelor
Fosfolipaza C	Hemoliză Lezarea țesuturilor Distrugerea surfactantului
Fimbrii (pili de tip IV)	Aderență la epiteliu
Lipaza	Lezarea țesutului
Histamina	Pierderea integrității epiteliului
Exoenzima S	Aderența la epiteliu Citotoxică
Leucocidina	Citotoxică pentru neutrofile și limfocite

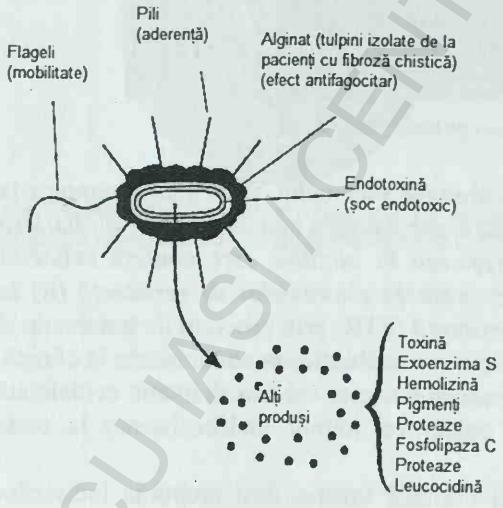


Fig. 174. Reprezentarea schematică a spectrului de factori de virulență prezenți la *P. aeruginosa* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/:1).

Majoritatea infecțiilor cu *Pseudomonas* sunt atât invazive, cât și toxigenice. Infecția cu *Pseudomonas* se desfășoară în trei etape:

- aderența bacteriană și colonizarea;
- invazia locală;
- infecția sistemică generalizată.

Ps. aeruginosa aderă la celulele epiteliale ale tractului respirator superior și ale altor epitelii, prin intermediul *fimbriilor* (pili de tip IV), cu rol esențial în virulență, în mișcarea în tirbușon, în procesele de transformare genetică și în absorbția bacteriofagului. Pilii de tip IV sunt structuri fibrilare lungi, alcătuite dintr-o singură proteină structurală – *pilina*. Pilii, cu o lungime de 1000– 4000 nm, diametrul de 5,2 nm, se pot relaxa sau contracta, prin asamblarea și dezasamblarea subunităților de pilină de la baza pilului. Retracția pilului favorizează mișcarea. Pilina este

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

codificată de gena pilA din operonul *pil* şi este iniţial sintetizată sub forma unui precursor – prepilina- care este clivat, N-metilat şi asamblat în pilul matur. Fiecare proteină de pilină conţine o regiune pentru legarea de receptor; totuşi regiunile pentru legare se găsesc doar la moleculele de la vârful pilului. Regiunea terminală a pilului pare a fi prima care realizează contactul dintre bacterie şi celulele gazdei. Până la cinci monomeri de pilină sunt expuşi la capătul pilului, rezultând un receptor multivalent, comun pentru interacţiile lectină-carbohidrat.

Adezinele piliare par să se lege la receptori specifici pentru *galactoză, manoză* sau *acid sialic* (fosfosfingolipidele asialo-GM1 şi asialo-GM2) ai membranei celulelor epiteliale. Colonizarea tractului respirator de către *Pseudomonas* pare a fi facilitată de producerea unei proteaze care degradează fibronectina şi expune receptorii de fimbrii de pe suprafaţa celulelor epiteliale sau de leziuni anterioare ale ţesutului. Aceasta din urmă a fost denumită *aderenţă oportunistă* şi are un rol important în infecţiile conjunctivei oculare care produc keratite, în infecţiile tractului urinar şi tractului respirator produse de *Pseudomonas*. Receptorul de la nivelul celulelor traheale pentru pilii de la *Pseudomonas* este probabil acidul sialic (acid N-acetil neuraminic). Tulpinile mucoide care produc exopolizaharide (alginat) au o adezină suplimentară sau alternativă care se ataşează la N-acetil glucozamina din mucusul traheobronşic.

Pe lângă pili şi polizaharidele mucoide este posibil ca *Pseudomonas* să exprime alte două adezine ale suprafaţei celulare pentru a coloniza epiteliul respirator. În plus, este posibil ca exoenzima S legată de suprafaţa celulei să aibă rol de adezină la glicolipidele celulelor epiteliului respirator.

Exopolizaharidele mucoide produse de *Ps. aeruginosa* sunt polimeri de acid manuronic şi glucuronic (*alginat*). Stratul mucos de alginat formează matricea biofilmului care ancorează celulele, iar în focarele infecţioase protejează bacteriile de fagocite, de acţiunea cililor epiteliului tractului respirator, de anticorpi şi de proteinele complementului. Biofilmele formate de tulpinile mucoide de *Ps. aeruginosa* sunt, de asemenea, mai puţin sensibile la antibiotice decât corespondentele lor planctonice.

Capacitatea *Ps. aeruginosa* de a *invada* ţesuturile depinde de rezistenţa sa la fagocitoză şi la alţi efectori ai sistemului imunitar al gazdei, de enzimele extracelulare şi de toxinele care penetrează barierele fizice şi astfel contribuie la invazia bacteriană. Capsula bacteriană sau stratul mucos protejează efectiv celulele de efectul opsonizant al anticorpilor şi complementului şi de fagocite.

Ps. aeruginosa secretă proteaze cu rol de factori de virulenţă, care îşi exercită acţiunea în stadiul invaziv: *elastaza, proteaza alcalină (colagenaza)* şi *fibrinolizina*. Elastaza clivează colagenul, IgG, IgA şi proteinele complementului. De asemenea, lizează fibronectina şi blochează motilitatea cililor. Proteaza alcalină interferă cu formarea fibronectinei şi o lizează. Împreună, elastaza şi proteaza alcalină distrug substanţa fundamentală a corneei şi alte structuri de susţinere care au în structura lor fibronectină şi elastină şi inactivează IFN γ şi TNF.

Ps. aeruginosa produce alte trei proteine solubile implicate în invazie: *citotoxina* şi *două hemolizine*. Citotoxina este o proteină formatoare de pori. A fost iniţial denumită *leucocidină* datorită efectului său asupra neutrofilelor, dar se pare că este citotoxică pentru majoritatea celulelor eucariote.

Citotoxicitatea faţă de epiteliul alveolar pare să se datoreze fosfolipazei, translocată în celule prin sistemul de secreţie de tip III. Liza celulelor alveolare mediază patologia infecţiei cu *Ps. aeruginosa*.

Cele două hemolizine sunt *fosfolipaza C* şi *lecitinaza*. Se pare că acţionează sinergic pentru a distruge lipidele şi lecitina. Citotoxina şi hemolizinele contribuie la invazie prin efectele lor citotoxice asupra celulelor eucariote.

Pigmenţii produşi de *Pseudomonas* sunt de asemenea implicaţi în virulenţă. Pigmentul albastru, *piocianina*, modifică funcţia normală a cililor epiteliului respirator, dezagregă epiteliul şi exercită un efect proinflamator asupra fagocitelor. Un derivat al piocianinei, *piochelina*, are rol de siderofor şi este produs în condiţii de insuficienţă a Fe. Pioverdina nu pare să aibă rol de factor de virulenţă.

Diseminarea. Invazia are loc pe calea curentului sanguin, iar diseminarea bacteriilor din situsurile locale de infecţie este probabil mediată de aceiaşi factori extracelulari care determină colonizarea iniţială deşi nu este clar modul în care se produce infecţia sistemică.

Ps. aeruginosa este rezistent la fagocitoză şi la răspunsul bactericid al serului datorită capsulei sale mucoide şi posibil datorită LPS. Proteazele inactivează complementul, clivează anticorpii IgG şi inactivează IFN, TNF şi probabil alte citokine. Lipidul A al LPS de la *Pseudomonas* mediază manifestările patologice ale septicemiilor Gram negative: febră, hipotensiune, coagulare intravasculară etc.

Toxigenitatea

Ps. aeruginosa produce două proteine extracelulare: exoenzima S şi exotoxina A.

Bacteria produce substanţe difuzibile, majoritatea având efecte toxice pentru celulele în cultură, animale şi om. Factorii toxici sunt reprezentaţi de endotoxine şi de exotoxine. LPS este mai puţin toxic decât cel al altor bacterii Gram negative.

Exotoxina A (ETA), o proteină termolabilă de 613 aminoazici, este compusul proteic cel mai toxic, în cantitate foarte variabilă, în funcţie de tulpină. Este principalul vector de virulenţă, cu acţiune letală pentru şoarece şi câine şi este mult mai toxică decât LPS. Efectele cele mai ample se produc la nivelul ficatului, cu o reducere a ratei sintezei proteinelor cu cca. 50%. Este un amestec format din *două fosfolipaze C*. Ambele hidrolizează fosfatidil-colina, dar una dintre ele este şi sfingomielinază (Songer, "97). Doza letală a preparatului purificat este mai mică de 1 μg/kg.

Analiza cromatografică a evidenţiat că molecula ETA este organizată în trei domenii:

- domeniul N-terminal, care se leagă de receptorul celular, neidentificat;
- un domeniu intern, de translocaţie;
- domeniul C-terminal, catalitic.

Exotoxina A (ETA) este internalizată prin mecanismul endocitozei mediate de receptori. În endosom este prelucrată proteolitic şi generează fragmentul catalitic C-terminal. Exotoxina A prezintă asemănări structurale şi ale modului de acţiune cu toxina diftrică, dar nu poate fi tranformată în anatoxină.

Exotoxina A este parţial identică cu toxina diftrică, dar este diferită antigenic. Se fixează pe un receptor diferit al celulei gazdă, dar pătrunde în celule printr-un mecanism asemănător cu cel identificat pentru toxina diftrică şi are acelaşi mecanism enzimatic de acţiune, blocând acţiunea factorului 2 de elongaţie al sintezei proteice. Producerea exotoxinei A este reglată de Fe exogen.

Exotoxina A pare să medieze atât manifestările locale cât şi pe cele sistemice produse de *Ps. aeruginosa*. Are activitate necrozantă la situsul colonizării bacteriene. Tulpinile toxigene sunt mai virulente şi produc o formă mai gravă de pneumonie decât cele nontoxigene. Exotoxina A purificată are letalitate ridicată pentru animale, inclusiv pentru primate. Dovada indirectă a rolului exotoxinei A în procesul patologic este adusă de faptul că şansele de supravieţuire ale pacienţilor cu septicemii produse de *Pseudomonas* sunt mai mari la cei care prezintă titruri ridicate ale anticorpilor anti-exotoxină A.

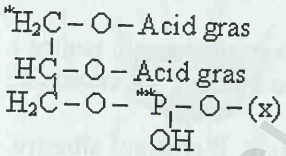
Exoenzima S este probabil o exotoxină de tip A-B cu activitate *ADP-ribozilantă* (pentru o varietate de proteine eucariote) caracteristică exotoxinelor. Exoenzima A este produsă în timpul creşterii bacteriene în ţesuturile lezate şi poate fi detectată în sânge înainte de apariţia bacteriei. S-a sugerat că exoenzima S poate inhiba funcţia fagocitelor din ţesuturi, generând un teren favorabil pentru invazie.

Exotoxina S este produsă de tulpinile care produc infecţii pulmonare şi are un potenţial toxic inferior faţă de exotoxina A.

Proteazele (elastaza, colagenaza) au efecte toxice minime, dar produc leziuni tisulare.

Hemolizina este fosfolipaza C.

Proteaza, elastaza, hemolizina, exotoxina A alterează ţesuturile gazdei, distrug proteinele complementului, imunoglobulinele şi fribronectina (proteina care protejează celulele epiteliale de bacteriile care tind să adere). În plămân, fosfolipaza C atacă pelicula de surfactant (acoperă endoteliul alveolar şi inhibă transudarea fluidelor capilare). Acţiunea conjugată a toxinelor şi enzimelor duc la necroza tisulară şi facilitează invazia bacteriană.



**Situsul fosfolipazei C.

Patologie

Infecţiile apar la pacienţii spitalizaţi timp îndelungat, mai ales la cei imunodeprimaţi şi, în general, după mai multe cure de antibiotice. Poarta de intrare este diferită, dar în două treimi din cazuri este reprezentat de:

- translocaţia digestivă la bolnavii cu aplazie medulară;
- focare de infecţie digestive;
- dispozitive intravasculare sau urinare;
- leziuni tegumentare sau ale mucoaselor (arsuri, răni, plăgi chirurgicale).

Infecţiile respiratorii sunt produse de *Ps. aeruginosa* aproape în exclusivitate la indivizii cu leziuni ale epiteliului tractului respirator inferior (care apar în bolile cronice pulmonare şi în insuficienţa cardiacă congestivă) sau la pacienţii imunocompromişi (neutropenii, chimioterapie).

Infecția tractului respirator inferior la bolnavii cu fibroză chistică de către tulpinile mucoide de *Ps. aeruginosa* este greu sau chiar imposibil de tratat.

Fibroza chistică (FC) este o boală a transportului anormal al electroliților și a secreției mucoase a glandelor exocrine și a epiteliilor secretoare. Fibroza chistică se caracterizează prin triada: boală cronică pulmonară cu tuse persistentă; transpirație crescută bogată în electroliți; insuficiență pancreatică, ce duce la malabsorbție și diaree recurentă. Creșterea concentrației de sare a transpirației este un criteriu de diagnostic al FC. Electroliții din transpirație sunt Na^+, Cl^-, Ca^{2+}. Pe măsură ce fluidul secretat de glandele sudoripare trece în ductul glandei, în mod normal NaCl este absorbit și transpirația secretată este hipotonică. La pacienții cu FC, ductul glandei este mai puțin permeabil pentru Cl^- și NaCl nu se absoarbe. Secrețiile mucoase ale pacienților cu FC, inclusiv secreția traheobronșică, sunt vâscoase și deficitare în apă și electroliți, cu proprietăți reologice modificate. Glicoproteinele au componenta glucidică modificată și formează complexe insolubile cu Ca^{2+}. Vâscozitatea crescută a secreției mărește incidența infecției cu *Ps. aeruginosa, S. aureus* și *H. influenzae*. Infecția cu *S. aureus* este cea mai frecventă, dar este controlată cu antibiotice. *H. influenzae* perturbă funcția cililor și favorizează infecția cu *Ps. aeruginosa*. Tulpinile de *Pseudomonas* sunt rezistente la majoritatea antibioticelor și treptat devin dominante în microbiota pulmonară a pacienților cu FC. Tulpinile de *Ps. aeruginosa* izolate inițial de la pacienții cu FC sunt nemucoide, dar ulterior se comută la varianta mucoidă, producătoare de alginat, odată cu progresia procesului infecțios. La pacienții cu FC, predomină net (în proporție de 90%) infecția cu tulpini mucoide. Severitatea infecției pulmonare se corelează direct cu prezența tulpinilor mucoide.

Ps. aeruginosa mucoid nu produce septicemie, spre deosebire de celelalte tipuri de infecții cu tulpini nemucoide.

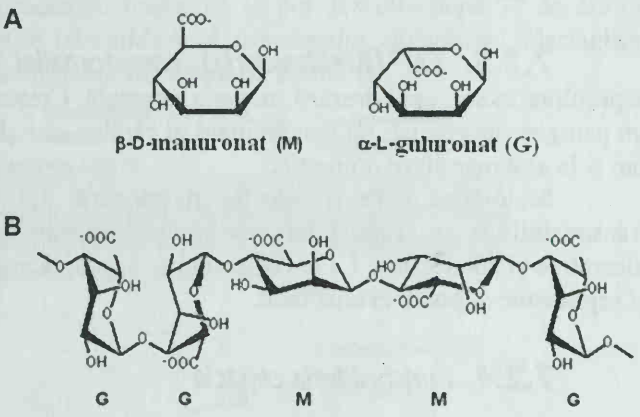
Sinteza alginatului conferă câteva avantaje pentru rezistența *Ps. aeruginosa* în țesutul pulmonar:

- stratul de alginat împiedică legarea anticorpilor la determinanții antigenici ai suprafeței celulei, care ar condiționa fagocitoza opsonică. Tulpinile mucoide sunt mai rezistente la fagocitoza non-opsonică;
- alginatul este o barieră mecanică pentru antibioticele aminiglicozidice;
- alginatul mărește gradul de aderență al tulpinilor mucoide de celulele epiteliale ale tractului pulmonar, inhibând activitatea mecanismelor de *clearing* pulmonar;
- alginatul nu inhibă sinteza anticorpilor specifici, dar pare să inhibe IMC.

Alginatul este un copolimer linear de acid D-manuronic și acid guluronic. Resturile de maluronat pot fi modificate cu grupări O-acetil, ceea ce îl deosebește de alginatul produs de alge.

LPS de *Ps. aeruginosa* are o toxicitate scăzută și nu are rol în patogenitatea infecției la pacienții cu FC.

Ps. aeruginosa provoacă *bacteriemii* în primul rând la pacienții imunocompromiși. Factorii predispozanți includ malignitatea hematologică, imunodeficiența datorată SIDA, neutropenia, *diabetus mellitus* și arsurile severe. Majoritatea bacteriemiilor produse de *Pseudomonas* sunt infecții nosocomiale (25% din totalul bacteriemiilor dobândite în spitale).



Structura moleculară a alginatului (www.aapspharmscitech.org/articles).

Ps. aeruginosa produce meningite și abcese cerebrale, prin contaminare de la nivelul urechii interne și sinusurilor paranazale, sau prin inocularea directă consecutivă traumelor craniene, intervențiilor chirurgicale, folosirii metodelor invazive de diagnostic sau prin extinderea procesului infecțios de la un situs îndepărtat, cum ar fi tractul urinar.

Ps. aeruginosa este agentul etiologic predominant în unele cazuri de otite externe incluzând "otita înotătorului". Bacteria este rar întâlnită în mod normal în ureche, dar populează adeseori canalul auditiv extern după rănire, inflamație sau în condiții de umiditate crescută. La diabetici produce otita invazivă.

Ps. aeruginosa poate cauza infecții devastatoare ale ochiului, fiind una dintre cele mai comune cauze ale keratinei bacteriene. Bacteria a fost izolată și identificată ca agent etiologic al *oftalmiei neonatale*. *Pseudomonas* poate coloniza epiteliul ocular prin atașarea fimbriilor la receptorii reprezentați de *acidul sialic*. Dacă sistemul de apărare este compromis, bacteria poate prolifera rapid și prin secreția enzimelor (elastaza, proteaza alcalină și exotoxina A) produce o infecție rapidă și distructivă care poate duce la pierderea întregului ochi.

Infecțiile oaselor și articulațiilor cu *Pseudomonas* sunt rezultatul inoculării directe a bacteriei sau prin diseminarea din alte situsuri de infecție. Infecțiile cu origine sanguină sunt mai des întâlnite la consumatorii de droguri intravenoase, la cei cu infecții ale tractului urinar sau cu infecții pelvice. *Ps. aeruginosa* are un tropism particular pentru articulațiile fibrocartilaginoase ale scheletului axial și produce osteomielite cronice, de obicei datorate inoculării directe a osului. Este cel mai comun patogen implicat în *osteocondritele* consecutive rănirii prin înțepare la nivelul membrelor inferioare.

Infecțiile tractului urinar cauzate de *Ps. aeruginosa* sunt de obicei dobândite în spital (12% din infecțiile urinare nosocomiale) și sunt datorate cateterizării tractului urinar, utilizării instrumentarului infectat sau intervențiilor chirurgicale. *Pseudomonas* se numără printre cei mai aderenți dintre patogenii epiteliului vezicii urinare, iar infecția poate avea loc pe cale ascendentă sau descendentă. Dar *Pseudomonas* poate invada torentul sanguin de la nivelul tractului urinar, aceasta fiind sursa a 40% din totalul bacteriemiilor provocate de *Pseudomonas*.

Ps. aeruginosa poate produce leziuni la indivizii imunocompromiși la nivelul oricărui segment al tractului gastrointestinal de la orofaringe la rect, fiind implicat în etiologia infecțiilor perirectale, diareii la copii, gastroenteritelor tipice și enterocolitelor necrozante.

Ps. aeruginosa poate cauza o varietate de infecții ale pielii, atât localizate, cât și difuze. Factorii predispozanți comuni sunt colapsul tegumentului datorat arsurilor, traumelor sau dermatitelor; condiții de umiditate ridicată (urechea înotătorilor și zonele periungulare ale degetelor atleților și militarilor, regiunea perineală la copii), neutropenie și SIDA. *Pseudomonas* a fost de asemenea, implicat în etiologia foliculitelor și formelor de *acneea vulgaris*.

Ps. aeruginosa produce *endocardita* după ce colonizează endocardul, în special la consumatorii de droguri, ca și valvele cardiace artificiale, după invazia pe cale sanguină.

7.2.2. *Ps. mallei*

Ps. mallei produce, la cal, o boală cunoscută sub denumirea de *răpciugă*. Este un parazit adevărat și nu poate supraviețui în mediul extern. Focarul primar al infecției este plămânul. Infecția se poate transmite la om.

7.2.3. *Ps. (Burkholderia) pseudomallei*

Ps. (Burkholderia) pseudomallei este un bacil aerob Gram negativ, imobil, saprobiont în sol, apă, orezării, materia vegetală. Crește la 42°C, oxidează glucoza, lactoza etc. și este un patogen oportunist, un contaminant al rănilor, dar și agentul *meloidozei*, o boală tropicală fatală la om și la alte mamifere domestice.

Meloidoza este o infecție pulmonară. La cabaline *Ps. pseudomallei* produce morva, transmisibilă la om. La cal, infecția implică plămânul, dar evoluează sistemic, cu leziuni subcutanate ulcerative și adenopatie. La om infecția începe cu ulcerații tegumentare sau ale mucoaselor, adenopatie și septicemie și poate evolua fatal.

7.2.4. *Burkholderia cepacia*

Complexul *Burckholderia caepacia* (Bcc) cuprinde 9 specii cu distribuție ubiquitară, cu efecte atât benefice, cât și detrimentale asupra plantelor și mediului (fig. 175), putând fi izolate din ape, sol, plante, animale și materie organică în descompunere, rețelele de apă potabilă, mediile umede spitalicești (Mahenthiralingam și colab., 2005). Patogenul prezintă interes pentru pacienții cu fibroză chistică, care pot fi purtători asimptomatici, sau infecția poate evolua cu deteriorarea progresivă a țesutului pulmonar, în câteva luni sau foarte rapid, cu apariția pneumoniei necrozante și a bacteriemiei. A fost demonstrată transmiterea bacteriei între pacienții cu fibroză chistică. Virulența este multifactorială, implicând aderența la celulele epiteliale ale gazdei și la mucină prin intermediul

pililor, producerea de proteaze, hemolizine, LPS cu toxicitate ridicată şi cu o structură unică care îi conferă rezistenţă la fagocitoză, elaborarea de melanină care protejează celulele bacteriene de sistemele microbicide dependente de oxigen şi potenţialul parazitism intracelular recent demonstrat la această specie, ca şi la *B. pseudomallei* (Speert, 2001). S-a demonstrat că infecţia cu *Ps.aeruginosa* favorizează colonizarea ulterioară cu *Burckholderia caepacia.*

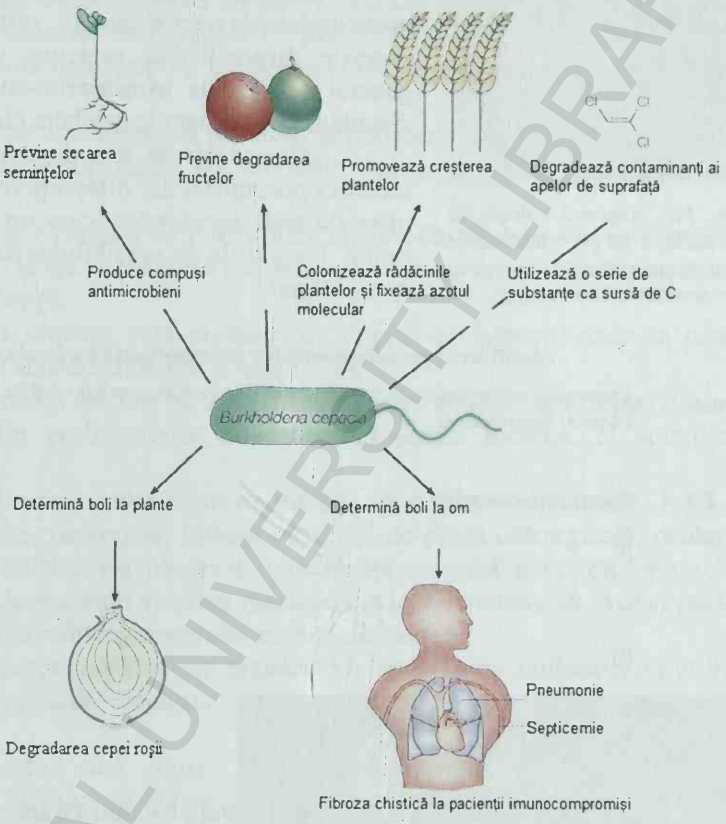


Fig. 175. Efectele benefice şi negative ale speciei *Burkholderia cepacia* (http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n2/images/nrmicro1085-f1.gif).

B. cepacia se dezvoltă pe medii obişnuite pentru bacili Gram negativi (sau pe medii selective cu colistin), dar au creştere mai lentă decât enterobacteriile (coloniile se pot dezvolta după 72 de ore de incubare). Prezintă rezistenţă multiplă la antibiotice (cloramfenicol, trimetoprim, quinolone, β-lactamice, aminoglicozide, colistin) (fig. 176), amplificată de creşterea sub formă de biofilme.

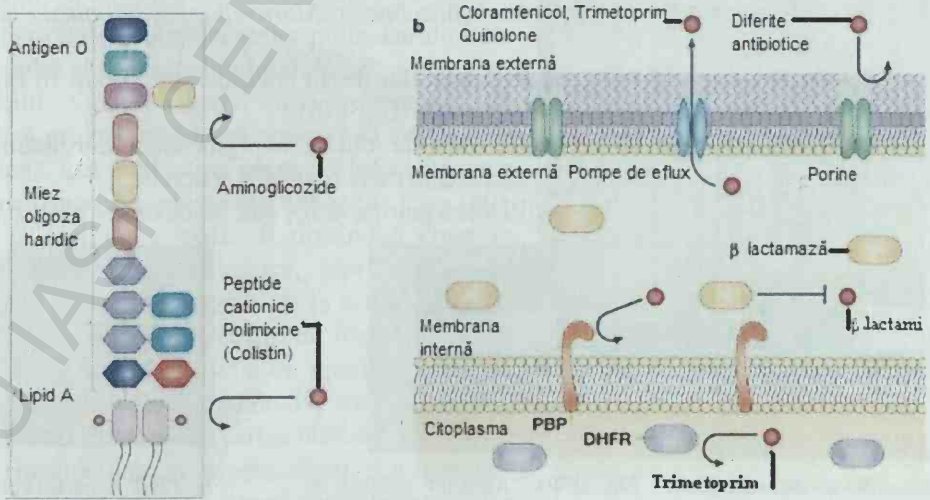


Fig. 176. Reprezentarea schematică a mecanismelor de rezistenţă la antibiotice la *B. caepacia* (pompe de eflux, β-lactamaze, DHF-reductaze, impermeabilitate pentru antibioticele peptidice, imposibilitatea de legare a aminoglicozidelor la LPS) www.nature.com/.../n2/images/nrmicro1085-f3.gif.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7.2.5. *Stenotrophomonas maltophilia*

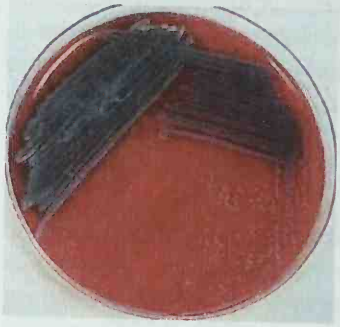


Fig. 177. Aspectul culturii de *St. maltophilia* pe geloză sânge (http://amanwithaphd.files.wordpress.com/2008/05/steno.jpg).

St. maltophilia este o specie ubiquitară care formează pe medii de cultură colonii verde-lavandă sau gri (fig. 177), este oxidazo-negativă şi lizin-decarboxilază pozitivă.

Este din ce în ce mai frecvent raportat ca agent al infecţiilor nosocomiale de tract respirator, urinar, ale plăgilor sau al bacteriemiilor asociate dispozitivelor protetice (Brooks şi colab., 2007). Este în general sensibil la trimetoprim-sulfametoxazol şi ticarcilină cu acid clavulanic şi rezistent la celelalte clase de antibiotice.

Alte specii de pseudomonade (tabelul 20) pot fi izolate din infecţii oportuniste, dar diferenţierea lor necesită realizarea unui număr mare de teste biochimice, care nu pot fi efectuate în laboratoarele de rutină. Profilurile de sensibilitate la antibiotice sunt diferite faţă de *Ps. aeruginosa.*

Tabelul 20.

Clasificarea pseudomonadelor de importanţă medicală (Gilligan et al., 2003).

Grupuri şi subgrupuri de omologie stabilite pe baza analizei ARNr	Genuri şi specii
I Specii fluorescente	*Ps. aeruginosa*
	Ps. fluorescens
	Ps. putida
Specii nefluorescente	*Ps. stutzeri*
	Ps. mendocina
II	*Burkholderia pseudomallei*
	B. mallei
	B. cepacia
	Ralstonia pickettii
III	*Comamonas* sp.
	Acidovorax sp.
IV	*Brevundimonas* sp.
V	*St. maltophilia*

7.2.6. Genul *Acinetobacter* cuprinde bacterii Gram negative nefermentative, saprobionte în sol, apă, apă menajeră şi hrană, comensale ale tegumentului personalului medical şi pacienţilor, dar sunt de asemenea patogeni nosocomiali importanţi, mai ales în unităţile de terapie intensivă.

Datorită versatilităţii lor metabolice pot avea rol important într-o varietate de procese industriale, cât şi în biodegradarea unor poluanţi ai mediului.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology a clasificat genul *Acinetobacter* în familia *Moraxellaceae* (Rossau et all, 1991), care include: *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Psychrobacter* şi organisme înrudite.

Sunt bacili Gram negativi în fază logaritmică, dar devin cocoidali şi grupaţi în diplo- sau în lanţuri de lungimi variabile în fază staţionară de creştere (fig. 178).

Multe tulpini sunt capsulate. Coloniile sunt de obicei nepigmentate, dar anumite tulpini formează colonii albe sau crem, ce variază în consistenţă de la netede la mucoide.

Pentru izolatele din mediul clinic se utilizează geloza sânge sau MacConkey (fig. 179A, B).

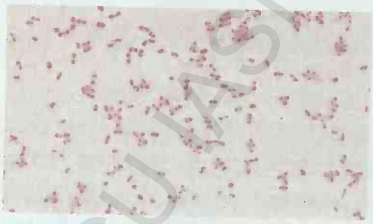


Fig. 178. Acinetobacter baumannii. Cocobacili Gram negativi.

Fig. 179A. Aspectul culturii de *Acinetobacter baumanii* pe mediu MacConkey (colonii lactozo-pozitive)

Fig. 179B. Aspectul culturii de *Acinetobacter baumanii* pe geloză sânge (http://microblog.me.uk/wp-content/uploads/a_baum_02.jpg).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Toți membrii genului *Acinetobacter* sunt strict aerobi și pot crește la 33°C, unele tulpini preferă temperaturi de 30–42°C, iar cele izolate din mediu 20–30°. Toate tulpinile de *Acinetobacter* sunt oxidazo-negative și catalazo-pozitive. Reacția oxidazei diferențiază tulpinile de *Acinetobacter* de alte genuri înrudite. Toate tulpinile de *Acinetobacter* sunt oxidazo negative deoarece nu au citocrom C, dar au citocrom b și ocazional citocrom d și P_{450}.

Majoritatea tulpinilor cresc pe medii minerale simple. Unele tulpini pot utiliza glucoza și pot produce hemoliza pe geloză sânge datorată fosfolipazei C. Majoritatea tulpinilor sunt rezistente la penicilină, iar unele izolate clinice sunt rezistente de asemenea la cefalosporine prin supraproducerea unei cefalosporinaze cromosomale.

Speciile genului *Acinetobacter* contaminează pacienții și personalul medical putând fi izolate dintr-o mare varietate de surse: praf, echipamente de ventilație, bazine de spălat, alimente, ploști, textile, mobilier.

Tulpinile de *Acinetobacter* pot persista în mediu mai multe zile până la câteva săptămâni, chiar în condiții de desicație. Pe lângă *Acinetobacter baumannii* s-au izolat și alte specii de *Acinetobacter*, ca *A. johnsonii* și *A. lwoffii*.

Cel puțin 25% din indivizii sănătoși sunt purtători de tulpini de *Acinetobacter* ca parte a microbiotei normale a tegumentului (Schreckenberger și colab., 2003).

Frecvența infecțiilor nosocomiale cauzate de *Acinetobacter* este greu de determinat deoarece izolarea acestor microorganisme din probe clinice nu reflectă neapărat infecția, ci colonizarea (Schreckenberger și colab., 2003).

Acinetobacter a fost izolat din mai multe tipuri de infecții oportuniste (septicemie, 3–5% din pneumoniile nosocomiale, endocardite, meningite, infecții cutanate, de plagă chirurgicală, oculare și de tract urinar). La persoanele spitalizate s-a observat o incidență crescută a infecțiilor tractului respirator cu *Acinetobacter* mai ales la pacienții ventilați mecanic din terapie intensivă. Acești pacienți sunt adesea contaminați/colonizați la nivelul tegumentului cu *Acinetobacter*.

Izolatele clinice de *Acinetobacter* sunt frecvent rezistente la majoritatea antibioticelor utilizate pentru tratamentul infecțiilor nosocomiale (inclusiv carbapenemi).

Deși speciile de *Acinetobacter* sunt considerate a avea potențial patogen redus, virulența tulpinilor implicate în diferite infecții este conferită de;
1) prezența capsulei polizaharidice formată din L ramnoză, D glucoză, acid D glucuronic, D manoză;
2) aderența la celulele epiteliale mediată de fimbrii și/sau polizaharide capsulare;
3) sinteza lipazelor;
4) toxicitatea componentelor polizaharidice ale peretelui celular și prezența lipidului A.

Bacilii Gram negativi non-fermentativi se caracterizează printr-o rezistență crescută la substanțele antimicrobiene, atât antibiotice, cât și dezinfectanți, prin mecanisme intrinsece, naturale sau dobândite (fig. 180). Rezistența la antibiotice poate fi dobândită chiar în cursul tratamentului cu antibiotice, fapt ce necesită testarea tulpinilor izolate succesiv de la același pacient. În cazul tulpinilor izolate din cazuri de fibroză chistică, timpul de incubare trebuie să fie de minim 24 de ore. Bacilii Gram negativi non-fermentativi sunt sensibili la carboxipeniciline (ticarcilina, carbpenicilina) și ureidopeniciline (mezlocilina și piperacilina). La pseudomonade, testul rapid pentru evidențierea β-lactamazelor nu se recomandă, datorită multiplelor mecanisme de rezistență la aceste antibiotice (CLSI, 2009).

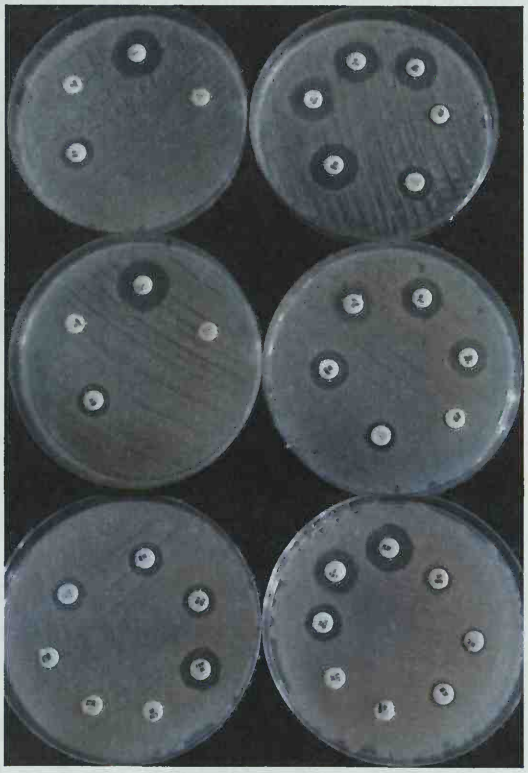


Fig. 180. Fenotipuri de rezistență la antibiotice ale unor tulpini de *A. baumanii* (sensibile exclusiv la colistin), izolate din secreții traheale ale pacienților spitalizați.

BUCUR UNIVERSITY LIBRARY

7.2.7. Alte specii de bacili Gram negativi

Genul *Actinobacillus*

A. actinomycetemcomitans este un cocobacil Gram negativ (fig. 181, 182) cu creştere lentă, adesea asociat cu actinomicozele. Este agentul etiologic al infecţiei periodontale la adolescenţi, a endocarditelor, abceselor, osteomielitei şi al altor infecţii (Steinberg şi Del Rio, 2005). Este sensibil la tetraciclină, cloramfenicol, penicilină G, ampicilină şi eritromicină.

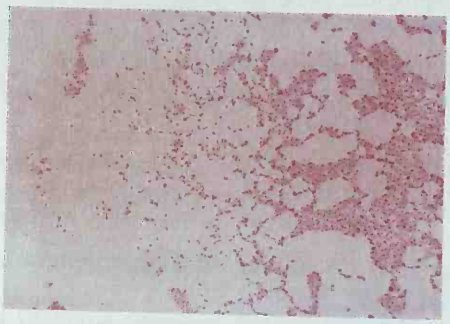


Fig. 181. A. actinomycetemcomitans – aspectul microscopic, pe frotiu colorat Gram (http://phil.cdc.gov/PHIL_Images/03272002/00006/PHIL_1937_lores.jpg).

Fig. 182. Aspectul culturii de *A. actinomycetemecomitans* pe geloză sânge (www.blackholm.com/parodontitis/kulturschale.jpg).

Genurile *Achromobacter* şi *Alcaligenes*

Sunt bacili Gram negativi (fig. 183–185), oxidază-pozitivi, cu mobilitate de tip peritrih spre deosebire de pseudomonade, care prezintă mobilitate de tip polar. Utilizează citratul ca sursă de C, produc uree şi degradează glucoza în aerobioză şi anaerobioză (Steinberg şi Del Rio, 2005). Au fost izolaţi din microbiota normală, echipamente de ventilaţie şi sisteme de dializă, iar ocazional din sânge, urină, LCR, plăgi, abcese.

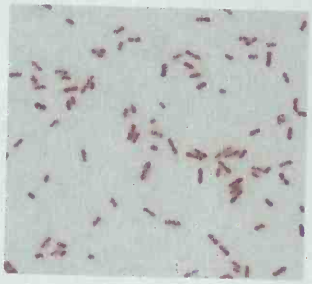


Fig. 183. Alcaligenes faecalis Bacili pe frotiul colorat Gram (http://www.microbelibrary.org/microbelibrary/files/ccImages/Articleimages/Atlas-Gram/Alcaligenes%20faecalis%20fig2.jpg).

Fig. 184. Aspectul culturii de *Alcaligenes faecalis* pe geloză sânge (lookfordiagnosis.com).

Fig. 185. Aspectul culturii de *Achromobacter* pe geloză simplă (www.flickr.com/photos/synonyme_c/3883406432/).

Genul *Ochrobactrum*

Genul *Ochrobactrum* include specii asemănătoare cu *Achromobacter* şi *Alcaligenes*. *Ochrobactrum anthropi* este adesea izolată din bacteriemii asociate dispozitivelor intravasculare şi poate contamina, de asemenea produsele biologice (Steinberg şi Del Rio, 2005).

Genul *Capnocytophaga*

Capnocytophaga cuprinde specii cu creştere lentă, capnofile, Gram negative, fusiforme sau filamentoase (fig. 186), facultativ anaerobe, care necesită CO_2 pentru creştere (fig. 186). Prezintă mobilitate prin alunecare, care se reflectă în extinderea treptată a coloniilor pe medii de cultură (fig. 186–188).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 186. Polimorfismul celulelor de *Capnocytophaga* pe frotiul colorat Gram (www.scielo.cl/fbpe/img/rci/v24n1/fig09-04.jpg).

Fig. 187. Morfologia coloniilor de *Capnocytophaga* pe geloză sânge (www.scielo.cl/fbpe/img/rci/v24n1/fig09-04.jpg).

Fig. 188. Cultura de *Capnocytophaga* pe geloză sânge, cu evidențierea hemolizei (www.scielo.cl/fbpe/img/rci/v24n1/fig09-04.jpg).

Unele tulpini de *Capnocytophaga* produc o substanță care modifică activitatea PMNN. Speciile de *C. ochracea, C. sputigena* şi *C. gingivalis* sunt rezidente ale microbiotei normale. Ocazional, pot determina bacteriemii şi infecții sistemice cu evoluție gravă, în special la pacienții imunodeprimați (mai ales neutropenici sau pacienți cu ulcerații ale mucoasei cavității bucale). *C. canimorsus* (anterior DF-2-*dysgonic fermenter* 2) constituent al microbiotei normale la câine, poate produce infecții fulminate la pacienții asplenici şi alcoolici. *C. cynodegmi* (DF-2-*like*) poate produce infecții consecutive muşcăturii sau zgârieturii de câine şi pisică (Steinberg şi Del Rio, 2005).

Genul *Cardiobacterium*

Cardiobacterium hominis este un bacil Gram negativ pleomorf (fig. 189, 190), facultativ anaerob, constituent al microbiotei tractului respirator superior şi intestinal, care ocazional poate determina endocardita (Steinberg şi Del Rio, 2005).

Fig. 189. Aspectul microscopic al frotiului colorat Gram din cultură de *C. hominis.* Bacili Gram negativi, grupați în stea sau rozetă (www.john-libbey-eurotext.fr/en/revues/medecine/bdc/e-docs/).

Fig. 190. Aspectul culturii de *Cardiobacterium hominis* pe geloză sânge (http://3.bp.blogspot.com/_5s6uG0AE5v4/SxO55b8EFsI/AAAAAAAAAns/ZCJoZ0uwcSw/s1600/cardiohom.jpg).

Genul *Chromobacterium*

Ch. violaceum este un bacil Gram negativ asemănător cu pseudomonadele, care ocazional poate produce un pigment violet (fig. 191). În zonele subtropicale poate produce abcese, diaree, infecții septice, în urma contaminării pe cale intestinală sau prin țesutul cutanat lezat. Chromobacteriile sunt sensibile la cloramfenicol, tetracicline şi aminoglicozide (Steinberg şi Del Rio, 2005).

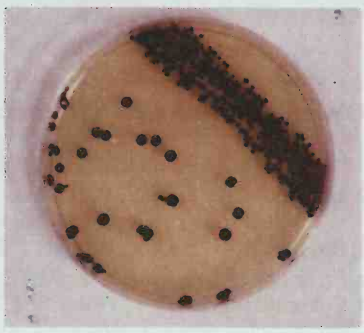


Fig. 191. Colonii violacee de *Chromobacterium* pe agar Muller Hinton (http://www.scielo.br/img/fbpe/rimtsp/v42n2/n2a08fg1.gif).

BUCHAREST CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Eikenella corrodens

E. corrodens este un bacil Gram negativ, de dimensiuni mici (fig. 192), cu exigențe nutritive, oxidază-pozitiv, capnofil, nu fermentează zaharurile, constituent al microbiotei cavității orale și intestinale la 40–70% dintre indivizi. 50% dintre tulpini formează colonii intruzate în agar (fig. 193).

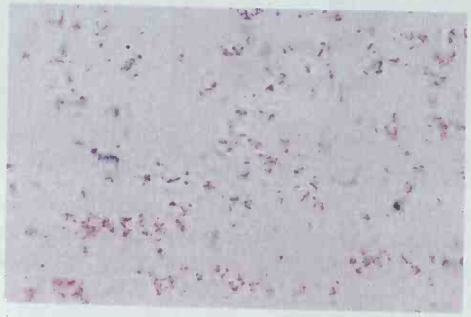


Fig. 192. E. corrodens pe frotiul colorat Gram (http://content8.eol.org/content/2009/11/25/03/31427_large.jpg).

Fig. 193. Colonii de *Eikenella* pe geloză sânge (www.buddycom.com/bacteria/gnr/cardiohomth.gif).

Fig. 194. Colonii de *Cryseobacterium* pigmentate galben (http://www.carlosdavey.com/files/mars_microbes_200.jpg).

Este adesea asociat cu streptococii în infecțiile mixte cu contaminare orală. Tulpinile de *Eikenella* sunt constitutiv rezistente la clindamicină și sensibilă la peniciline și cefalosporine (Steinberg și Del Rio, 2005).

Genul *Chryseobacterium*

Sunt bacili Gram negativi, lungi, fini, oxidazo-pozitivi, imobili, proteolitici și slab fermentativi, care formează colonii pigmentate galben, specific (fig. 194). *Chryseobacterium* este adesea izolat din puroaie superficiale, conducte și echipamente medicale expuse la o sursă de apă contaminată și nesterilizate. Ocazional poate coloniza tractul respirator superior și rareori este cauza meningitei (specia *Chryseobacterium meningosepticum*). Speciile acestui gen sunt în general multirezistente la antibiotice (Steinberg și Del Rio, 2005).

Genul *Kingella*

Grupul *Kingella* include 3 specii, de importanță medicală fiind *K. kingae*. Sunt bacili Gram negativi, cu forme cocobacilare sau diplococi (fig. 195), hemolitici pe geloză sânge.

Intră în componența microbiotei orale și poate genera ocazional infecții osoase, articulare și ale tendoanelor, probabil după diseminarea în sânge prin microhemoragiile consecutive periajului dentar. Este sensibilă la penicilină, ampicilină, eritromicină și la alte antibiotice (Steinberg și Del Rio, 2005).

Fig. 195. Kingella kingae pe frotiul colorat Gram (http://www.nature.com/eye/journal/v20/n9/images/6702119f2.jpg).

Bibliografie

1. May T. B., Shinabarger D., Maharaj R., Kato J., Chu L., DeVault J. D., Roychoudhury S., Zielinski N. A., Berry A., Rothmel R. K .1991. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. Clin. Microbiol. Reviews. 4: 191–206.
2. Govan J. R., Deretic V. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* – Microbiol. Rev. 60(3): 539–574.
3. Brooks G. F., Caroll K.C., Butel J. S., Morse S. A. eds. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition Jawetz, Melnick și Adelberg. http:// www.accessmedicine.com
4. Coburn B., Sekirov I., Finlay B.B. 2007.Type III Secretion Systems and Diseas. Clin. Micr. Reviews. 20 (4): 535–549.

BIBLIOTECA UNIVERSITY LIBRARY

5. http://lib.jiangnan.edu.cn/ASM/123-4.jpg
6. www.aapspharmscitech.org/articles
7. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/:1
8. http://microblog.me.uk/wp-content/uploads/a_baum_02.jpg
9. http://www.nature.com/nrmicro/journal/v5/n12/images/nrmicro1789-f2.jpg
10. Gilligan P. H. et al. 2003. *Burkholderia, Stenotrophomonas, Ralstonia, Brevundimonas, Comamonas, Delftia, Pandoreae* and *Acidovorax*. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Murray PR et al (editors). ASM Press.
11. Kiska D. L., Gilligan P. H. 2003. *Pseudomonas*. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Murray PR et al (editors). ASM Press.
12. Schreckenberger PC et al. 2003. *Acinetobacter, Achromobacter, Chryseobacterium, Moraxella,* and other nonfermentative Gram negative rods. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Murray PR et al (editors). ASM Press.
13. Steinberg J. P., Del Rio C. 2005. Other Gram negative and gram-variable bacilli. In: *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases,* 6th ed. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (editors). Churchill Livingstone
14. Mahenthiralingam E., Teresa A. Goldberg U., Goldberg J. 2005. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. Nature Reviews Microbiology. 3: 144–156
15. www.nature.com/.../n2/images/nrmicro1085-f3.gif
16. Speert DP. Understanding *Burkholderia cepacia*: Epidemiology, Genomovars, and...: Virulence. 2010. MedscapeCME, September 1, medscape.com
17. Clinical Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptiblity test. M2A10, vol. 29, no. 1.
18. http://phil.cdc.gov/PHIL_Images/03272002/00006/PHIL_1937_lores.jpg)
19. www.blackholm.com/parodontitis/kulturschale.jpg)
20. www.scielo.cl/fbpe/img/rci/v24n1/fig09-04.jpg
21. www.buddycom.com/bacteria/gnr/cardiohomth.gif
22. http://amanwithaphd.files.wordpress.com/2008/05/steno.jpg
23. http://3.bp.blogspot.com/_5s6uG0AE5v4/SxO55b8EFsI/AAAAAAAAAns/ZCJoZ0uwcSw/s1600/cardiohom.jpg
24. http://content8.eol.org/content/2009/11/25/03/31427_large.jpg
25. http://www.carlosdavey.com/files/mars_microbes_200.jpg
26. http://www.nature.com/eye/journal/v20/n9/images/6702119f2.jpg
27. www. lookfordiagnosis.com
28. http://www.microbelibrary.org/microbelibrary/files/ccImages/Articleimages/Atlas-Gram/Alcaligenes%20faecalis%20fig2.jpg)
29. www.flickr.com/photos/synonyme_c/3883406432
30. www.aapspharmscitech.org/articles

7.3. Familia *Pasteurellaceae*

7.3.1. Genul *Pasteurella*

Speciile de *Pasteurella* sunt patogene în primul rând pentru animale, dar pot produce infecţii variate şi la om. Sunt cocobacili Gram negativi (fig. 196–198), imobili, aerobi, facultativ anaerobi, cu aspect bipolar pe frotiurile colorate, pozitivi pentru testele catalazei şi oxidazei.

Fig. 196. Cultura de *P. multocida* pe geloză sânge (colonii nehemolitice, cu miros caracteristic) (http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english/).

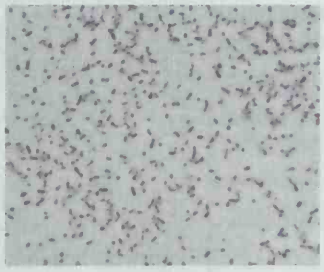


Fig. 197. P. multocida. Cocobacili sau bacili Gram negativi) (http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english/).

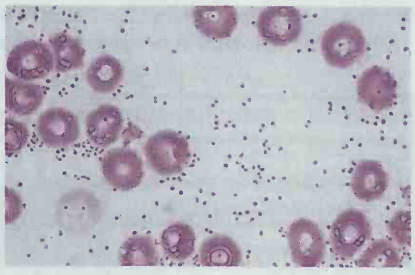


Fig. 198. P. multocida pe frotiu colorat Giemsa din hemocultură (se observă formele cocobacilare) (http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/phototheque/Pasteurella_multocida_Hemoc.jpg).

P. multocida populează tractul respirator şi gastrointestinal al animalelor domestice şi sălbatice. Infectează rănile tegumentare umane, după contactul cu animalele de casă (câine, pisică). La păsări, cal, ovine, porc produce septicemia hemoragică.

BCU "MIHAIL KOGĂLNICEANU" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7.3.2. Genul *Haemophilus*

g. *Haemophilus* aparţine familiei *Pasteurellaceae* şi reuneşte un grup de bacterii Gram negative, pleomorfe (în produsele patologice - LCR, expectoraţii- sunt prezenţi cocobacili Gram negativi până la forme alungite), ce cresc pe medii îmbogăţite cu sânge parţial degradat (geloză chocolat), de unde şi denumirea actuală, de *Haemophilus influenzae*. Genul *Haemophilus* a fost descoperit de Pfeiffer în 1890 în expectoraţia bolnavilor de gripă, crezându-se iniţial că această bacterie este agentul etiologic al gripei, fiind numit *Bacillus influenzae*. Ulterior, s-a demonstrat că *Haemophilus* este bacteria care determină complicaţiile bacteriene la bolnavii de gripă.

H. influenzae este un agent patogen important pentru om, care infectează mucoasa tractului respirator superior la copii şi adulţi şi produce infecţii meningeale şi ale tractului respirator, în special la copii. Colonizarea cu tulpini capsulate creşte riscul apariţiei manifestărilor patologice. Poate de asemenea coloniza mucoasa vaginală, fiind o sursă posibilă de contaminare şi de infecţii genitale şi neonatale cu posibilă evoluţie septicemică. Este responsabil mai ales de infecţiile comunitare în sfera ORL la adult şi copil şi în suprainfecţiile bronhopulmonare la adult (dar şi la copii, în cazul existenţei unor factori de risc cum ar fi mucoviscidoza sau bronhodilataţia). Aceste infecţii sunt provocate de tulpini necapsulate. Alterarea şi modificarea mucoaselor din bronşitele cronice poate de asemenea favoriza colonizarea şi multiplicarea bacteriilor. Manifestările invazive sunt reprezentate mai ales de meningite (cauza cea mai frecventă la copiii sub 5 ani nevaccinaţi), epiglotite, pneumonii, artrite, pericardite, celulite.

Infecţiile localizate apar după scăderea eficienţei mecanismelor de apărare locală (în special disfuncţia sistemului mucociliar după sau în cursul unei infecţii virale sau la fumători). Posedă adezine şi IgA-proteaze care favorizează colonizarea şi infecţia, deşi rolul acestor factori în virulenţă nu a fost pe deplin stabilit.

În cursul manifestărilor invazive, capsula joacă un rol determinant, conferind protecţia faţă de fagocite şi faţă de acţiunea litică a complementului.

Starea septicemică se instalează după colonizarea iniţială a mucoasei, translocaţia prin mucoasă şi multiplicarea în ţesutul conjunctiv, urmată de diseminarea în vasele mici de sânge. Bacteria se poate multiplica în sânge, fiind protejată de capsula polizaharidică, faţă de multiplele sisteme bactericide din ser.

Identificarea speciilor de *Haemophilus* se bazează pe demonstrarea necesităţii factorilor de creştere X şi V (Tabelul 21). Factorul X este hemina, iar factorul V poate fi reprezentat de NAD sau de alte enzime.

Tabelul 21.

Distribuţia speciilor de *Haemophilus* importante în patologia umană în funcţie de necesităţile nutritive pentru factori de creştere (X = Hem; V = Nicotinamid-Adenin Dinucleotid) şi proprietăţile hemolitice (după Brooks şi colab., 2007).

	Necesită		Hemoliza
Specii	**X**	**V**	
H. influenzae (H aegyptius)	+	+	–
H. parainfluenzae	+	+	–
H. ducreyi	+	–	–
H. haemolyticus	+	+	+
H. parahaemolyticus	–	+	+
H. aphrophilus	–	–	–
H. paraphrophilus	–	+	–
H. paraphrophaemolyticus	–	+	+
H. segnis	–	+	–

Suprafaţa celulelor bacteriene patogene expune molecule glucidice, lipidice, accesibile recunoaşterii sistemului imunitar. Factorii majori ai virulenţei la *H. influenzae* sunt LPS şi polizaharidul capsular. Capacitatea de a produce infecţii (de a coloniza ţesuturile gazdei) este asociată în mod absolut, cu sinteza *polizaharidului capsular*. Faptul se explică prin proprietăţile chimiotactic negative ale polizaharidului capsular pentru fagocite. Polizaharidul capsular şi LPS inhibă acţiunea fagocitelor şi protejează celula de posibila liză mediată de proteinele activate ale complementului. Datorită structurii capsulare, complementul se activează la distanţă de membrana externă.

Polizaharidul capsular prezintă o accentuată *variaţie chimică*. Pe baza diferenţelor chimice ale polizaharidului capsular, tulpinile capsulate sunt împărţite în 6 grupe serologice (a–f). Virulenţa cea mai ridicată este evidenţiată pentru serogrupul b, urmat de a, e şi f. Antigenul capsular al *H. influenzae* b este un polimer de riboză-ribitol-fosfat.

Tulpinile care nu sintetizează polizaharidul capsular sunt mai puțin virulente sau avirulente și se găsesc în microbiota normală a tractului respirator superior, dar au avantajul că nu sunt recunoscute de anticorpii specifici față de antigenul capsular. Rata portajului pentru *H. influenzae* este de până la 80%, iar pentru *H. influenzae b*, agentul meningitei, pneumoniei, artritei septice, de până la 4%.

Anticorpii față de polizaharidul capsular de tip b sunt protectori, vârsta la care apare meningita fiind între 3 luni (când dispare protecția pasivă oferită de Ac maternali) și 3 ani (când se acumulează Ac la un titru protector). Vaccinarea determină obținerea unui titru protector încă din primele luni de viață.

Variația antigenică a LPS este generată de modificări ale setului de enzime implicate în calea sintezei sale. Populațiile bacteriene care exprimă variante biochimice ale LPS rezultă din modificări ale secvenței resturilor glucidice în *regiunea centrală a oligozaharidului LPS*.

Tulpinile netipabile de *H. influenzae* (NTHi) sunt cocobacili mici Gram negativi care nu produc și nu au genele codificatoare ale capsulei polizaharidice. Ele se diferențiază pe baza următoarelor criterii:

- heterogenitatea greutății moleculare a proteinelor membranei externe (OMP) și a antigenității lor;
- heterogenitatea antigenică a lipooligozaharidelor (LOS);
- markeri moleculari (evidențiați prin tipizare electroforetică, RFLP, PCR).

Capacitatea tulpinilor netipabile de *H. influenzae* de a adera la suprafața membranelor mucoase sau la matricea extracelulară este esențială pentru colonizarea și multiplicarea în organismul gazdă. NTHi colonizează regiunea nazofaringiană la 80% dintre indivizii umani. NTHi aderă preferențial la celulele epiteliului respirator cărora le lipsesc cilii sau sunt lezate structural.

Lipooligozaharidul (LOS) apare atât în formă secretată, cât și legată de celule. LOS eliberată din NTHi pare a fi mult mai potentă în stimularea secreției de către monocite, a citokinelor activatoare ale procesului inflamator. LOS este un antigen major al suprafeței celulare și reprezintă 4% din greutatea uscată a organismului. Regiunea lipidică este asemănătoare cu aceea a bacteriilor Gram negative, dar LOS conține catene laterale oligozaharidice, mai scurte decât catenele polizaharidice ale LPS de la *Enterobacteriaceae*.

Din punct de vedere funcțional, LOS de la *H. influenzae* este asemănătoare LPS de la enterobacterii. Heterogenitatea structurii LOS favorizează evaziunea față de mecanismele răspunsului imun. LOS are efecte toxice și produce leziuni pulmonare. Forma solubilă a LOS, termostabilă, inhibă mișcarea cililor și induce răspunsul inflamator: PMN sunt recrutate rapid în spațiul pulmonar. Creșterea numărului de PMN în plămân este însoțită de inflamația generală a țesutului, cu creșterea nivelului transferinei, factorului activator al plachetelor, lactoferinei). Legarea LOS de aceste proteine diminuează răspunsul PMN la LOS. Lactoferina, prezentă în granulele PMN și în secrețiile mucoase, se leagă de componenta lipidică a LOS, efectul fiind staza bacteriană și liza. Legarea LOS de lactoferină scade capacitatea bacteriilor de a stimula PMN.

H. influenzae nu produce exotoxine. Virulența este condiționată de prezența capsulei.

Mecanismele evaziunii mecanismelor de apărare ale gazdei. Organismul uman și animal posedă o serie de mecanisme de protecție, înnăscute și dobândite, față de agenții infecțioși. Bacteriile ca NTHi au dezvoltat numeroase mecanisme prin intermediul cărora evită sistemele de apărare și le folosesc pentru a coexista în calitate de comensale sau, în condițiile favorabile create de lezarea țesutului, se creează avantajul producerii infecției clinice.

IgA este foarte importantă pentru protecția tuturor suprafețelor mucoase. În tractul respirator superior predomină IgA_1. La copiii atopici (cu condiții predispozante pentru infecții ale tractului respirator), în secrețiile nazofaringiene, nivelul IgA_1 clivat este mai crescut decât la copiii sănătoși. Situația coincide cu un număr mai mare de bacterii colonizatoare ale tractului respirator superior, producătoare de proteaze ce clivează IgA_1. Unul dintre colonizatori este NTHi.

Tulpinile de *H. influenzae* capsulate produc 3 tipuri de proteaze, care clivează regiunea balama a moleculei IgA_1, rezultând fragmentul Fab monomeric, care-și păstrează parțial capacitatea de a lega Ag, și fragmentul Fc mono- sau dimeric, care-și pierde funcțiile biologice.

Tulpinile necapsulate de NTHi produc numai una dintre cele 3 proteaze ce clivează IgA_1.

Invazia celulelor epiteliale. Deşi considerate neinvazive, s-a demonstrat că NTHi pot să invadeze celulele gazdă, ca o modalitate de a evita răspunsul imun. Tulpinile necapsulate de *H. influenzae* invadează celulele endoteliale şi rămân în interiorul vacuolelor de fagocitoză, legate de membrană pentru o perioadă lungă, fără efect citopatic vizibil (Foxwell, 1998).

Variaţia antigenică a proteinelor membranei externe şi a LOS constituie un mecanism major prin care NTHi evită acţiunea sistemelor efectoare ale răspunsului imun. Tulpinile de NTHi cauzează infecţii, deşi în aparenţă anticorpii specifici sunt detectabili în secreţia salivară şi în ser. Datorită variaţiei antigenice accentuate a OMP şi a LOS, anticorpii sunt ineficienţi.

Diagnosticul de laborator. H. influenzae nu se dezvoltă pe geloză sânge decât în prezenţa *S. aureus* care stimulează creşterea coloniilor satelite de *Haemophilus*, deoarece eliberează NAD în mediul extracelular (fig. 199). Din produsele patologice reprezentate de tampoane nazofaringiene, puroi, sânge, LCR se execută frotiuri şi se inoculează mediu cu sânge (geloză chocolat cu sau fără adaos de factori de creştere – IsoVitaleX) (fig. 200–201).

La 24 de ore formează pe geloză chocolat colonii plate, gri-maronii, de 1–2 mm diametru (fig. 200).

Fig. 199. Aspectul satelitismului culturii nehemolitice de *H. influenzae* pe geloză sânge însămânţată cu *S. aureus.*

Fig. 200. Aspectul coloniilor de *H. influenzae* pe geloză chocolat (http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=16).

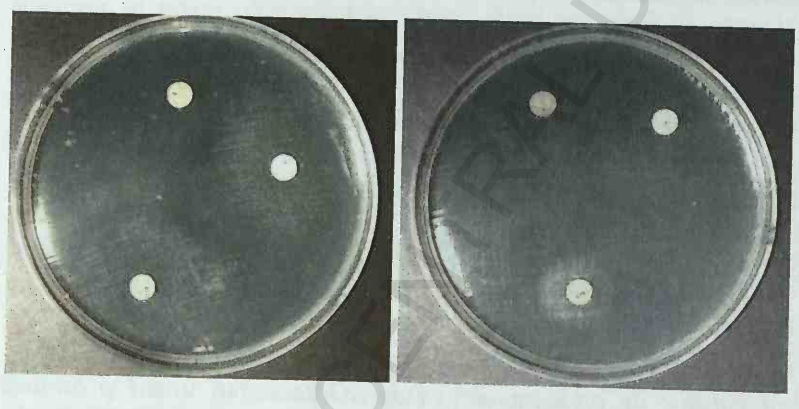


Fig. 201. Evidenţierea dependenţei unei tulpini de *H. parainfluenzae* faţă de factorul V (http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=16) şi respectiv a unei tulpini de *Haemophilus influenzae* faţă de factorii X şi V (http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=16).

H. influenzae se identifică prin reacţia de aglutinare pe lamă cu anticorpi specifici de tip, producându-se fenomenul de *quellung* (umflare a capsulei), ca şi la pneumococ.

Tratamentul infecţiilor cu *Haemophilus* este reprezentat de penicilină sau cefalosporine de generaţia a treia (în cazul tulpinilor rezistente prin producerea de β-lactamază sau PLP modificate). Profilaxia constă în administrarea de vaccinuri subunitare care conţin polizaharid capsular (timo-independent) asociat cu o proteină, anume anatoxina tetanică (pentru a deveni timo-independent) administrat sub forma a 3 injecţii subcutanate la o lună interval, înainte de 6 luni, cu un rapel la 18 luni.

Testarea sensibilităţii la antibiotice se realizează pe mediu HTM (*Haemophilus* Test Medium) (agar Müller Hinton cu factori de creştere X şi V şi extract de drojdii). Pentru izolatele din LCR se raportează ampicilina (care se utilizează pentru predicţia sensibilităţii la amoxicilină), o cefalosporină de generaţia a III-a, cloramfenicol şi meropenem. Cefalosporinele orale, tetraciclinele şi asocierile cu acid clavulanic pot fi utilizate empiric pentru tratamentul afecţiunilor respiratorii. Tulpinile rezistente la ampicilină şi amoxicilină produc o ß-lactamază de tip TEM-1 care poate fi detectată prin testul

rapid, cromogenic. Detecția de β-lactamazei este indicată la tulpinile izolate din cazuri clinice severe (meningită şi /sau bacteriemie) (CLSI, 2009). Tulpinile producătoare de ß-lactamază trebuie raportate ca rezistente pentru toate celelalte ß-lactamice, inclusiv pentru asocierile cu inhibitori, indiferent de rezultatele obținute *in vitro*.

H. ducreyi este o bacterie transmisă prin contact sexual, care produce şancrul moale (cancroidul), un ulcer dureros al organelor genitale externe, similar din punct de vedere al aspectului leziunilor cu şancrul sifilitic. Diagnosticul diferențial față de infecția virală cu herpes simplex şi față de limfogranulomatoza venerică este de asemenea necesar. Pentru izolare, se recomandă recoltarea cu tamponul de la baza leziunii ulceroase şi însămânțarea direct pe mediul de cultură (geloză chocolat cu 1% IsoVitaleX şi vancomicină), incubat la 33°C. Cu o rată mai mică de succes se poate realiza izolarea şi din produsul de biopsie rezultată prin puncționarea granuloamelor inghinale (WHO, 2003). Aspectul microscopic de bacili dispuşi în bancuri de peşte este revelator. Tratamentul se realizează cu ceftriaxonă administrată parenteral sau oral cu biseptol sau eritromicină, timp de 2 săptămâni.

H. aegyptius, numit bacilul Koch-Weeks sau *H. influenzae* biotip III sau *H. influenzae* biogrup *aegyptius*, se aseamănă foarte mult cu *H. influenzae,* fiind agentul etiologic al unei conjunctivite extrem de contagioase şi al febrei puerperale braziliene, care se manifestă prin febră, erupții cutanate, şoc şi exitus.

H. aphrophilus intră în componența microbiotei normale orofaringiene şi este întâlnit în etiologia endocarditelor şi a pneumoniilor. Se aseamănă cu *Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans.*

H. haemolyticus este hemolitic pe geloză sânge şi este prezent în microbiota tractului respirator, producând infecții uşoare la copii la acest nivel.

H. parainfluenzae se aseamănă cu *H. influenzae*, este rezident al mucoasei tractului respirator şi ocazional asociat cu endocardite şi uretrite. *H. suis* se aseamănă bacteriologic cu *H. influenzae* fiind implicat în apariția complicațiilor post viroză respiratorie la porc.

Bibliografie

Brooks G. F., Caroll K. C., Butel J. S., Morse S. A. eds. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition Jawetz, Melnick şi Adelberg. http:// www.accessmedicine.com

Clinical Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptiblity test. M2A10, vol. 29, no. 1.

http://bacterioweb.univ-fcomte.fr/phototheque/Pasteurella_multocida_Hemoc.jpg

http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english

WHO. 2003. Basic Laboratory Procedures in Clinical Bacteriology, 2nd Edition WW.

http://atlas.medmicro.info/index.php?jazyk=en&sekce=1&podsekce=16

7.4. Bordetella pertussis

Genul *Bordetella* cuprinde câteva specii, cea mai importantă din punct de vedere clinic fiind *B. pertussis*, un patogen care produce, exclusiv la om, infecții ale tractului respirator, a căror expresie clinică este tusea convulsivă. *B. parapertussis* produce o entitate clinică asemănătoare. *B. avium* este infecțioasă pentru curci, dar nu pentru organismul uman, *B. bronchiseptica* (*B. bronchicanis*) este infecțioasă pentru iepuri şi câini, şi ocazional pentru om, la care produce infecții respiratorii şi bacteriemii, în special la pacienții imunodeprimați. Recent au fost descoperite noi specii: *B. hinzii*, care produce bacteriemie si infecții de tract respirator, *B. holmseii*, responsabilă de bacteriemie la pacienții imunodeprimați şi *B. trematum*, care produce infecții de plagă şi otite medii.

B. pertussis este un cocobacil Gram negativ (fig. 202), strict aerob, capsulat, fastidios.

Pe frotiurile colorate cu albastru de toluidină se disting granule metacromatice bipolare. Tulpinile de *Bordetella* sunt catalază şi oxidază – pozitive. Ca sursă de carbon şi energie, *B. pertussis* metabolizează glucoza, lactoza, dar şi o serie de aminoacizi. Acidifică mediul, fără producere de gaze. Tulpinile virulente sunt hemolitice.

Pentru cultivare se utilizează bulion sintetic Stainer-Scholte şi geloză sânge Bordet-Gengou, incubate în aerobioză, la 35–37°C (fig. 203).

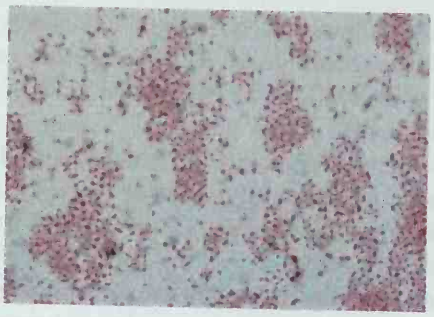


Fig. 202 B. pertussis. Morfologia celulelor pe frontiul colorat Gram (http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/disease-specifics.html).

Fig. 203. Aspectul coloniilor nehemolitice (stg.) şi hemolitice (dr.) de *B. pertussis* pe mediu Bordet-Genou (Hulbert şi Cotter, 2009).

B. pertussis sintetizează o varietate largă de antigene, unele cu rol de adezine, iar altele de toxine. Bacteria aderă la celulele epiteliale ciliate ale tractului respirator prin intermediul unei hemaglutinine filamentoase (FHA), a fimbriilor şi a pertactinei (PRN), şi rămâne localizată la acest nivel.

B. pertussis produce două tipuri de fimbrii, distincte serologic, cu rol în aderenţă la epiteliul tractului respirator superior. Pertactina este o proteină nefimbrială a membranei externe, cu rol în aderenţă.

Pertactina şi FHA conţin secvenţa de aminoacizi arg-glu-asp (RGD), cu rol de mediere a aderenţei la celulele mamaliene.

B. pertussis sintetizează câteva tipuri de toxine: toxina pertussis (PT), toxina adenilat ciclază (ACT), citotoxina traheală (TCT), toxina dermonecrotică (DNT).

Toxina pertussis este cea mai studiată şi produce cele mai multe activităţi biologice *in vivo*: leucocitoză, eliberarea histaminei din mastocite, stimulează secreţia insulinei, are activitate mitogenică. Este o toxină cu structură clasică de tip AB. Molecula de toxină se leagă prin subunitatea B de receptorii celulari, ulterior fiind internalizată. În citosol, subunitatea A catalizează adenozin 5'difosfat (ADP)-ribozilarea unui grup de proteine reglatoare ale sintezei guaninei. Consecinţa imediată este creşterea activităţii adenilat-ciclazei în celula gazdă.

Toxina adenilat ciclază (ACT) intră în celula gazdă, fiind activată de o calmodulină. Efectul său constă în conversia ATP în AMP ciclic şi creşterea nivelului AMPc în celula gazdă. *In vitro*, pe mediul cu sânge, ACT are efect hemolitic. ACT face parte din familia toxinelor bacteriene RTX, care au în comun o serie de secvenţe nonamerice repetate de aminoacizi, la capătul C al moleculei.

Citotoxina traheală este acidul anhidromuramic, legat cu un fragment dizaharid-tetrapeptid peptidoglicanic, eliberat de celulele bacteriene în faza de creştere. La om, TCT inhibă sinteza ADN în celulele ciliate ale traheii, produce extruzia celulelor ciliate din epiteliul căilor respiratorii superioare, măreşte frecvenţa celulelor cu deficit numeric al cililor şi este toxică pentru alte celule epiteliale. Diminuarea activităţii cililor perturbă grav rata de *clearance* mucociliar a epiteliului respirator. Astfel, eliminarea secreţiei mucoase şi a resturilor celulare se face exclusiv prin tuse.

Toxina dermonecrotică (DNT) produce vasoconstricţie şi necroză după injectarea subdermică la şoarece.

Lipopolizaharidul (LPS) este un factor de patogenitate, deoarece produce leziuni ale celulelor epiteliale ale tractului respirator superior şi este imunogenă.

In vitro, *B. pertussis* supravieţuieşte în monocitele umane şi în alte celule mamaliene. Eliminarea celulelor infectate *in vivo* cu agentul patogen este, probabil, mediată de imunitatea celulară. Imunitatea consecutivă infecţiei previne colonizarea epiteliului tractului respirator, iar imunitatea postvaccinare este protectoare faţă de efectele toxinelor.

B. pertussis prezintă o serie de mecanisme de evaziune a sistemului imunitar al gazdei. Antigenele secretate de *B. pertussis* sunt imunosupresoare. Citotoxina traheală lizează celulele ciliate ale tractului respirator superior şi împiedică eliminarea celulelor bacteriene, a mucusului şi a resturilor celulelor epiteliale din căile aeriene. *Clearance*-ul mucociliar este prima linie de apărare a epiteliului respirator, iar incapacitatea funcţională a cililor creează condiţii favorabile infecţiilor bacteriene secundare. Toxina adenilat ciclază şi toxina pertussis inhibă funcţia celulelor limfoide, prin inducerea unor niveluri intracelulare crescute de AMPc. Cele două toxine acţionează sinergic la nivelul

epiteliului respirator şi reduc capacitatea de migrare chimiotactică şi fagocitară a PMN, a monocitelor sanguine, a macrofagelor alveolare şi a limfocitelor. O altă cale de evitare a răspunsului imun este variaţia antigenică a fimbriilor, eveniment ce se produce cu frecvenţă mare la tulpinile infecţioase. Celulele de *B. pertussis* pot fi afimbriate sau pot avea unul sau două tipuri de fimbrii.

Expresia coordonată a acestui arsenal de factori de virulenţă este reglată de operonul *bvg* (*bordetella virulence genes*) sau *vir*, care acţionează prin mecanismul sistemelor de reglare cu două componente, existente şi la alte specii bacteriene (Todar, 2004) (fig. 204).

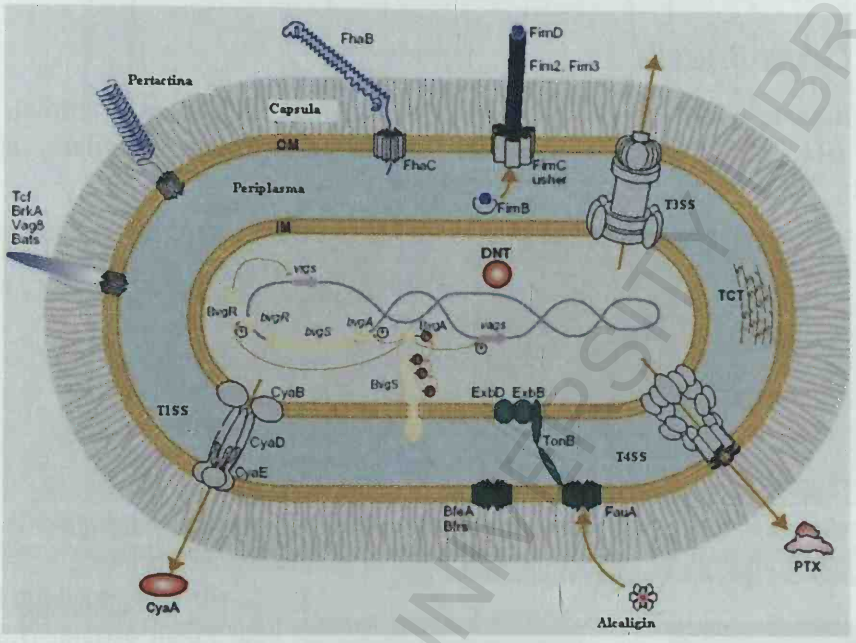


Fig. 204. Reglarea expresiei factorilor de virulenţă prin intermediul operonului *bvg* (Locht et al., 2001) (cya- adenilat ciclaza, alcaligin- siderofor, PTX- toxina pertussis, Fim- fimbrii, fha- fitohemaglutinina).

B. pertussis trăieşte perioade scurte în afara organismului uman. Sursa de infecţie este pacientul în stadiul cataral timpuriu al bolii. Contagiozitatea este mare. Copiii sub vârsta de 5 ani sunt cei mai sensibili. Bacteria se transmite pe cale respiratorie: aderă repid la celulele epiteliale ale traheii şi bronhiilor, unde se multiplică şi interferă cu mişcarea cililor. Procesul infecţios este localizat: bacteria nu trece în sânge, dar produce toxine cu efect necrotic. Epiteliul se infiltrează cu PMN.

Perioada de incubaţie este de 2 săptămâni. Procesul patologic produs de *B. pertussis*, care se manifestă cu predilecţie la copii, parcurge următoarele faze clinice: faza catarală durează 7–21 de zile de la momentul infecţiei şi este caracterizată de simptome nespecifice, asemănătoare răcelii comune; faza de stare (sau paroxistică) durează 2–4 săptămâni, marcată de tuse violentă şi inspiraţie zgomotoasă caracteristică acestei maladii, poate fi însoţită de cianoză, limfocitoza (16000–30000/μL), vomă, epuizare caşectică severă şi moarte; faza de convalescenţă, cu episoade de tuse a căror frecvenţă scade progresiv, durează 3–4 săptămâni. Maladia are o incidenţă semnificativă şi la adulţi.

Mecanismul major de protecţie a organismului uman faţă de infecţia cu *B. pertussis* este sinteza anticorpilor neutralizanţi. Titrul anticorpilor specifici faţă de toxina pertussis, hemaglutinina filamentoasă, pertactină şi fimbrii, se corelează cu un nivel crescut de protecţie faţă de infecţie. Dacă se produce, infecţia secundară este uşoară.

Infecţia neletală cu *B. pertussis* conferă protecţie de lungă durată. La pacienţii trecuţi prin maladia infecţioasă titrul IgA specific în ser şi salivă creşte semnificativ, ceea ce sugerează rolul protector al anticorpilor din secreţiile mucoase.

Vaccinul folosit pe scară largă, din anii '50, conţine celule virulente omorâte de *B. pertussis*, administrate în asociaţie cu anatoxinele difterică şi tetanică (vaccinul DTP). Vaccinarea începe la vârsta de 2 luni, în 3 doze repetate, urmate de două rapeluri la 4–6 ani. Vaccinul reduce incidenţa infecţiei, dar este reactogen (produce efecte locale): durere locală, eritem, edem, febră la 30–70% dintre cei vaccinaţi.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Bibliografie selectivă

1. http://www.cdc.gov/pertussis/clinical/disease-specifics.html
2. Hulbert R., Cotter P.A. 2009. Laboratory Maintenance of *Bordetella pertussis*. Current Protocols in Microbiology
3. Wood G. E., Friedman R. L. 1999. *Bordetella*. Infection and Immunity. EI, vol. 1, p. 377, Ed. Peter Delves, Ivan M. Roitt
4. Todar K. 2005. Todar's Online Textbook of Bacteriology. www.textbookofbacteriology.net
5. Locht C., Antoine R., Jacob-Dubuisson. 2001 F. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. Current Opinion in Microbiology, 4, 1: 82–89

7.5. Genul *Brucella*

Brucella este o bacterie obligat-parazită a organismului uman şi animal, cu localizare intracelulară (fig. 205). Este un cocobacil, cu frecvente forme bacilare, aerob, imobil, nesporulat (fig. 206).

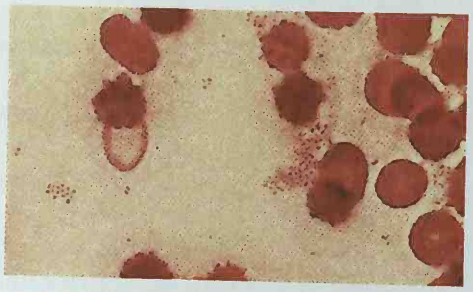


Fig. 205. Brucella melitensis - frotiu de sânge colorat Gram (http://www.google.at/imgres?imgurl=http://faculty.matcmadison.edu/mljensen/111CourseDocs/111Review/Unit1Review/BrucellaBC.jpg).

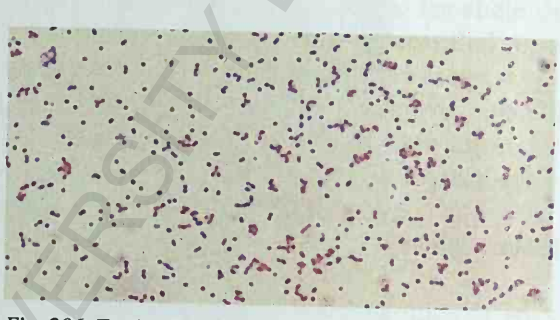


Fig. 206. Frotiu din cultură de *Brucella* – colorație Gram (x1000) (http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/202955).

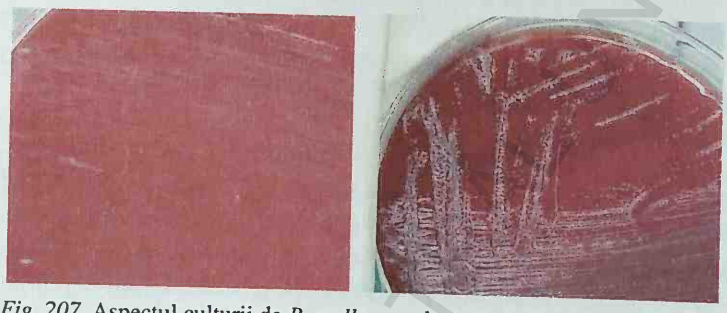


Fig. 207. Aspectul culturii de *Brucella* pe geloză sânge la 24 respectiv 48 de ore (http://doh.sd.gov/Lab/BT/Brucella/colony.aspx).

Se colorează Gram negativ sau Gram variabil (fig. 206). Genul *Brucella* cuprinde mai multe specii, infecțioase pentru diferite specii de animale: *B. melitensis* – pentru caprine; *B. suis* – pentru porcine; *B. abortus* – pentru cornute; *B. canis* – pentru câine. Alte specii infectează alte animale. Studiile de secvențiere ADN sugerează că tulpinile de *Brucella* aparțin unei singure specii, *B. melitensis*, cu varietăți multiple.

Brucella este o bacterie adaptată la parazitismul intracelular, iar necesitățile nutritive la cultivarea pe medii artificiale sunt complexe. Unele tulpini au fost cultivate pe medii sintetice, care conţin aminoacizi, vitamine, glucoză şi săruri. Izolarea se face pe mediu cu sânge şi culturile se dezvoltă în aerobioză, cu excepția tulpinilor de *B. abortus* care necesită o atmosferă de 5–10% CO_2 (fig. 207).

Speciile g. *Brucella* metabolizează glucoza, fără acidifierea mediului, sunt pozitive pentru testul catalazei şi oxidazei, produc H_2S, reduc nitrații la nitriți. Temperatura de pasteurizare a laptelui are efect letal asupra bacteriei.

La om, bruceloza este o infecție profesională a agricultorilor, crescătorilor de animale, veterinarilor, personalului abatoarelor. Calea de intrare este cea digestivă, prin laptele sau prin aerosolii infectați care ajung în contact cu membranele mucoase şi prin leziunile tegumentare, consecutiv contactului cu animalele şi țesuturile infectate (fig. 208).

De la poarta de intrare, *Brucella* ajunge pe cale limfatică, trecând prin ganglionii regionali, ductul toracic şi torentul sanguin, în țesuturile parenchimatoase (fig. 209), unde este fagocitată de macrofagele rezidente şi determină formarea *granuloamelor*, care sunt rezultatul proliferării mononuclearelor şi fibrozei şi sunt formate din celule gigante în care se găseşte agentul bacterian. Zona centrală se necrozează, rețeaua de fibre periferice se dezorganizează şi agentul infecțios este eliberat.

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

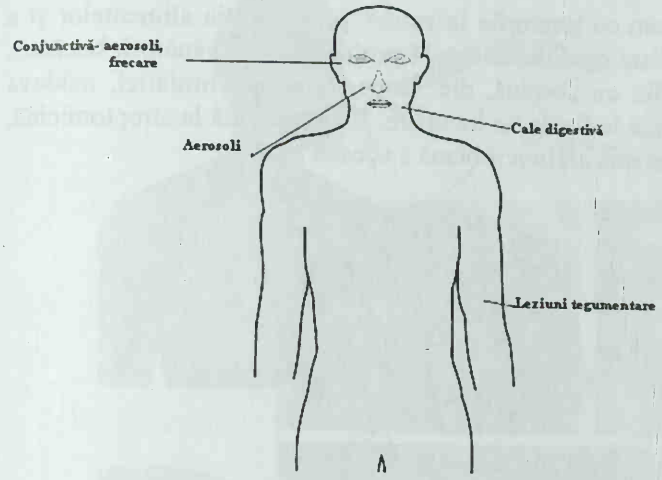


Fig. 208. Porţile de intrare pentru *Brucella* în organismul gazdă (Baron, 1996).

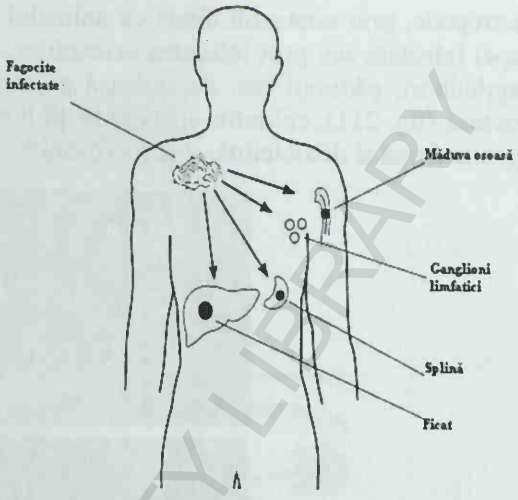


Fig. 209. Localizarea proceselor patologice cauzate de infecţia cu *Brucella* (Baron, 1996).

Speciile de *Brucella* au grade diferite de virulenţă, reflectată în tipul de leziuni (supurative sau nesupurative), de granuloame (cazeoase = necrotice sau necazeoase), în intensitatea reacţiei de hipersensibilitate întârziată la *brucelină* (un amestec de proteine secretate de celulele bacteriene). Răspunsul imun la endotoxină poate să amplifice efectele patologice ale infecţiei.

Ţesutul placentar şi membranele fetale ale cornutelor, porcinelor, ovinelor, caprinelor sunt bogate în *eritritol*, un factor de creştere pentru *Brucella*, care manifestă un tropism marcat pentru localizarea în sfera genitală. Rezultatul infecţiei este avortul. Eritritolul lipseşte în placenta umană şi avortul nu este produs de *Brucella*.

La om, *bruceloza* (febra ondulantă, insulară sau febra de Malta) are o perioadă de incubaţie de de 1–6 săptămâni, o fază acută cu stare de rău general, febră şi bacteriemie, urmată de stadiul infecţiei cronice, cu localizare în mai multe ţesuturi şi extinsă pe o perioadă de câţiva ani.

Pentru *diagnosticul* bacteriologic, sângele sau aspiratul din ganglionii limfatici sau din măduva osoasă se însămânţează pe mediu agarizat special (agar *Brucella*) pentru izolarea agentului infecţios. Coloniile sunt mici, nehemolitice.

Titrul IgM creşte în primele 7 zile de infecţie acută, atinge nivelul maxim la 3 luni şi rămâne ridicat pe toată perioada infecţiei cronice. Titrul IgG are o dinamică mai lentă: creşte semnificativ la 3 săptămâni. Pentru diagnosticul serologic se practică reacţia de *aglutinare* cu antigen *Brucella* standard, omorât, fenolizat. Titrul aglutinant mai mare de 80 unităţi este indiciul unei infecţii active.

7.6. *Francisella tularensis*

Francisella tularensis (Tulare = localitate din California, unde agentul patogen a fost izolat pentru prima dată) este o bacterie facultativ intracelulară, de formă cocobacilară, Gram negativă, oxidazo-negativă, imobilă, parazită la animalele sălbatice (fig. 210).

Grupul "F. tularensis" cuprinde patru biovarietăţi sau subspecii: "tularensis" (sau tipul A), predominant în America de Nord, este cel mai virulent, fiind asociat cu pneumonia letală, "palearctica" ("holarctica" sau tipul B) dominant în Asia şi Europa, mai puţin virulent, rareori asociat cu cazuri letale, "novicida", reuneşte tulpini nevirulente, care însă pot produce infecţii la pacienţi imunodeprimaţi şi "mediasiatica", dominant în Asia centrală. Se transmite la om prin

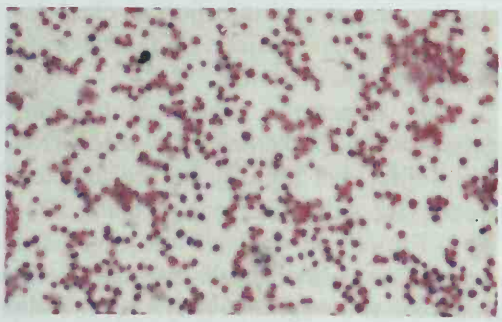


Fig. 210. F. tularensis. Cocobacili Gram negativi (CDC/Larry Stauffer, Oregon State Public Health Laboratory).

BCU BIBLIOTECA UNIVERSITY LIBRARY

artropode, prin contactul direct cu animalul sau cu țesuturile infectate, prin ingestia alimentelor și a apei infectate sau prin inhalarea aerosolilor. Este considerată boală profesională la vânători, bucătari, agricultori, pădurari etc. Se izolează pe mediu cu cisteină, din sânge, ganglioni limfatici, măduva osoasă (fig. 211), coloniile apărând la 48 h până la 5 zile de incubare. Este sensibilă la streptomicină, gentamicină și doxiciclină, agenți utilizați în terapia antimicrobiană a acestei infecții.

Fig. 211. Cultură de 48 de ore de *F. tularensis* pe mediu cu cisteină (http://en.academic.ru/ pictures/enwiki/70/Francisella_tularensis_01.jpg), cu sânge de berbec http://slph.ncpublichealth.com/bioterrorism/FrancisTularensis.asp), Agar tamponat cu extract de levuri, Charcoal și geloză chocolat (http://www.ppdictionary.com/bacteria/gnbac/tularensis.htm).

F. tularensis este foarte infecțioasă. Inhalarea aerosolilor cu circa 50 de celule, penetrarea prin microleziuni ale tegumentului sau a mucoaselor, poate să inițieze procesul infecțios. Formele clinice variază în funcție de poarta de intrare în organism: pseudogripale; ulcero-ganglionare brachiale cu extensie subclaviculară; faringo-ganglionare cu adenopatie; oculare – sindrom Parinaud cu adenopatie; cutanate – eritem polimorf; febrile sau tifoide; meningeene; pulmonare grave. Incubația este scurtă, debutul brusc, cu febră ridicată, frisoane, cefalee, astenie, tuse, mialgie, dureri abdominale, diaree. Nu există transmitere interumană, iar la om maladia este rareori mortală.

În cazul porții de intrare cutanate, la locul infecției, în 2–6 zile după contactul contaminant, apare o papulă* ulcerantă inflamată.

* Papula este o leziune tegumentară datorată dilatării vaselor sanguine dermice și apariția edemului infiltrat cu leucocite. Ganglionii cresc în volum și se necrozează.

Dacă agentul patogen este inhalat produce tularemia pulmonară (fig. 212).

Datorită potențialului infecțios foarte înalt, *F. tularensis* este o potențială armă biologică, fiind inclusă printre agenții infecțioși de clasă A.

Antigenele majore, un polizaharid și o proteină ale suprafeței celulare, dau reacție încrucișată cu antigenele de *Brucella*.

F. tularensis, odată pătrunsă în organism, infectează macrofagele, blochează fuziunea fagolizosomală, prevenind astfel acidifierea, distruge fagosomii și ajunge în compartimentul citosolic, unde proliferează rapid și induce apoptoza celulei gazdă, bacteriile eliberate inițiind un nou ciclu infecțios (fig. 213) (Clemens și colab., 2004).

Factorii de virulență identificați sunt reprezentați de pilii de tip IV implicați în aderența inițială la membrana celulei gazdă infectate, hemolizine (NLyA), ce prezintă omologie cu cele produse de *Pseudomonas aeruginosa* (HlyA) și fosfolipaze C (AcpA). La *F. tularensis* au fost identificate o serie de proteine de tip ABC (ATP *binding cassette*), implicate probabil în secreția factorilor de virulență (Atkins et al., 2006). Distrugerea fagosomului și proliferarea intracelulară sunt dependente de prezența unei proteine de 23-kD (IglC) codificată de o genă localizată pe o insulă de patogenitate.

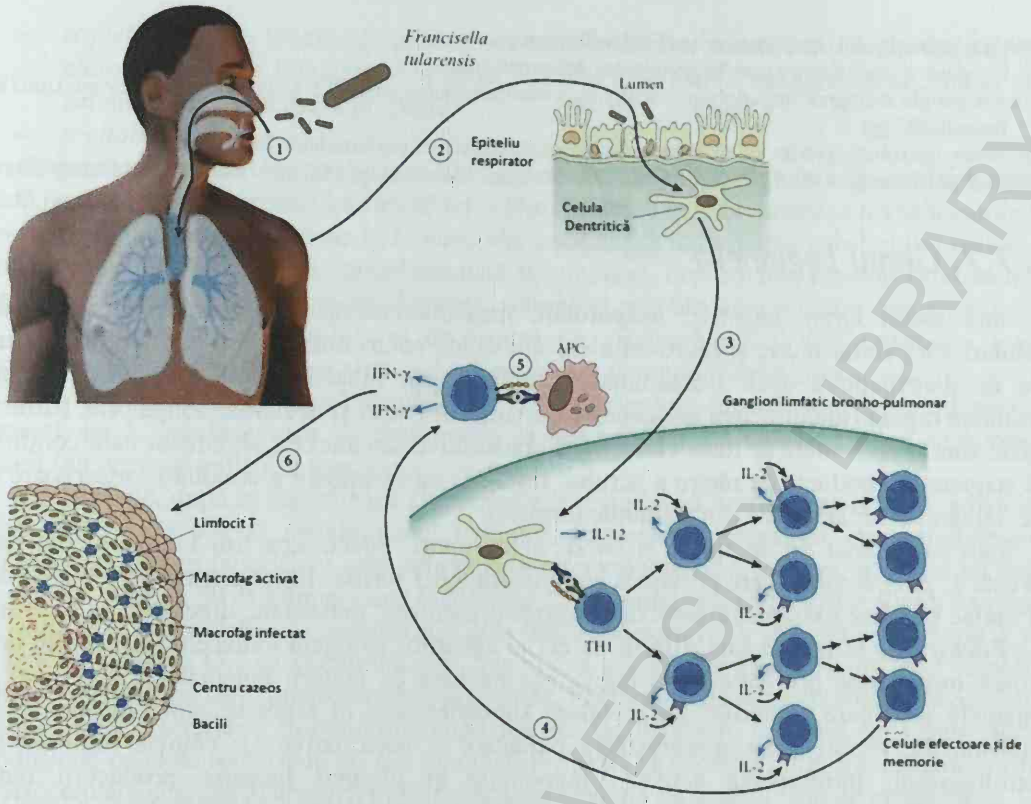


Fig. 212. Mecanismele patogenezei tularemiei pulmonare: *F. tularensis* ajunge în țesutul pulmonar odată cu inhalarea aerosolilor contaminați (1), traversează lamina propria a bronhiolelor respiratorii *via* celulelor M (2), antigenele bacteriene prelucrate sunt preluate de celulele dendritice (3) și transportate la nivelul ganglionilor limfatici regionali, unde sunt prezentate limfocitelor Th1, care proliferează (4), produc INFγ și activează macrofagele (5); persistența *F. tularensis* determină formarea granuloamelor (6) (Murray, 2009).

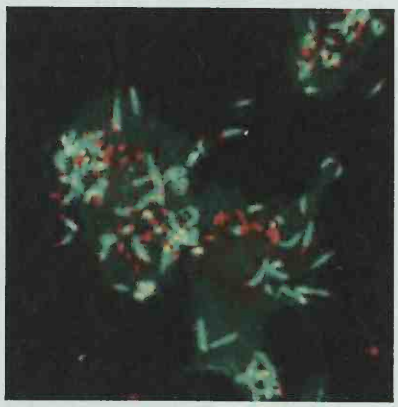


Fig. 213. F. tularensis în citosolul macrofagelor infectate. Imagine de microscopie confocală (http://www.necker.fr/u1002/html/team2.html).

Bibliografie selectivă

1. Atkins H., Dassa E., Walker N., Griffin K., Harland D., Taylor R., Duffield M., Titball R. 2006. The identification and evaluation of ATP binding cassette systems in the intracellular bacterium "Francisella tularensis" Res Microbiol 157 (60) 593–6.
2. Baron S, editor. Medical Microbiology. 4th edition. 1996.
3. CDC/Larry Stauffer, Oregon State Public Health Laboratory
4. Clemens D. L., Lee, B. Y., Horwitz, M. A. 2004. Virulent and avirulent strains of *Francisella tularensis* prevent acidification and maturation of their phagosomes and escape into the cytoplasm in human macrophages. *Infection and Immunity*, 72(6): 3204–3217.
5. http:// en. academic. ru/ pictures/enwiki/70/Francisella_tularensis_01.jpg
6. http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/202955
7. http://doh.sd.gov/Lab/BT/Brucella/colony.aspx

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8. http://slph.ncpublichealth.com/bioterrorism/FrancisTularensis.asp
http://www.ppdictionary.com/bacteria/gnbac/tularensis.htm
9. http://www.google.at/imgres?imgurl=http://faculty.matcmadison.edu/mljensen/111CourseDocs/111Review/Unit1Review/BrucellaBC.jpg
10. http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english/showmorf.asp?articleid=74
11. Murray P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A. 2009. Medicial Microbiology (6th ed.). Philadelphia: Mosby Elsevier.

7.7. Genul *Legionella*

Sunt bacili Gram negativi, nesporulați, neacidorezistenți, necapsulați, alungiți, facultativ intracelulari, cu habitat hidric şi hidro-teluric – ape dulci, soluri umede, larg răspândiți în natură şi în rețelele de distribuție a apei. Contaminarea se face prin inhalarea aerosolilor. Infecția necesită diagnosticare rapidă (identificarea antigenelor urinare, cultivare) şi declarare obligatorie. Rezervoarele potențiale sunt reprezentate de toate elementele constitutive sau anexele sistemelor care conțin o sursă de apă stagnantă (conducte de răcire a aerului, instalații de menținere a umidității, rezervoare de apă, piscine, fântâni, echipamentele din stațiunile termale).

S-au determinat 46 de specii şi 64 de serogrupuri. Specia cea mai importantă în patologia umană este *L. pneumophila* care provoacă legioneloza, cu 3 forme clinice distincte: boala legionarilor, febra Pontiac şi forme extrapulmonare: hematologice, cardiace, musculare, digestive, retinite, sinuzite.

Factorii de virulență sunt diferiți de cei ai agenților patogeni extracelulari, care au dezvoltat numeroase mecanisme prin care evită fagocitoza mediată de factorii humorali protectori ai gazdei. Mecanismele prin care bacteriile intracelulare supraviețuiesc în fagocite sunt diferite: localizarea extrafagosomală, rezistența la mecanismele oxidative şi neoxidative ale celulei, inhibiția fuziunii fagosom-lizosomi, întreruperea activării fagocitului şi implicit blocarea producerii radicalilor intermediari ai O_2.

Studiul interacțiunii *Legionella*-fagocit, *in vitro*, nu a evidențiat însă nici unul dintre mecanismele prin care alte bacterii scapă distrugerii intracelulare. *L. pneumophila* este fagocitată şi rămâne localizată în interiorul fagosomului. Studii recente au demonstrat faptul că *Legionella* utilizează sistemul de secreție de tip 4 (T4SS) numit Dot/Icm pentru a injecta în citoplasma celulei infectate efectori care interceptează proteinele şi veziculele transportoare ale gazdei, transformându-le într-un compartiment protector, similar reticulului endoplasmic, în care se multiplică. Proteinele efectoare sunt unice şi nu prezintă omologie cu cele ale altor specii bacteriene. Celulele bacteriene defective pentru T4SS dot/Icm nu pot supraviețui în macrofage (Machner şi colab., 2006, 2007) (fig. 214).

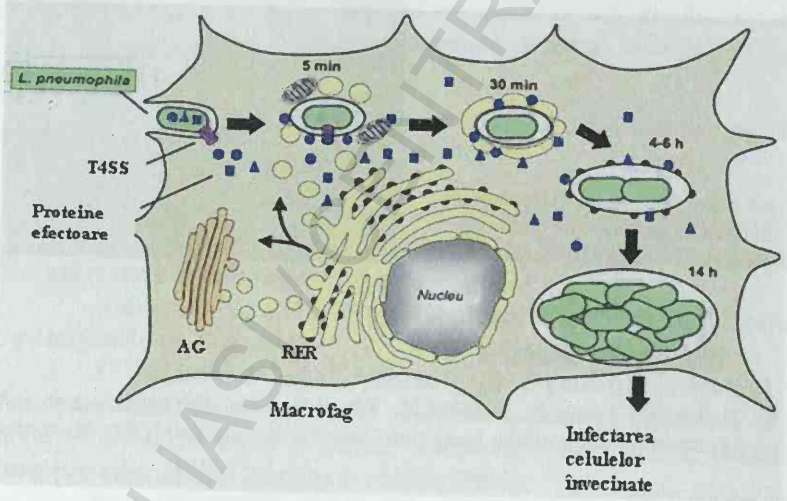


Fig. 214. Interacțiunea *L. pneumophila* cu celula gazdă. Bacteria utilizează sistemul de secreție de tip 4 (Dot/Icm T4SS) pentru a descărca în citoplasma celulei gazdă o multitudine de proteine efectoare (figurate în negru), prin care patogenul recrutează vacuolele de transport ale celulei gazdă pentru a se multiplica (Machner et al., 2009).

După contactul inițial, *Legionella* declanşează creşterea ratei metabolice a fagocitului (neutrofile şi monocite). Bacteriile genului *Legionella* sunt sensibile la radicalii intermediari ai reducerii O_2, produşi de fagocite. *L. pneumophila* nu inhibă fuziunea fagosom-lizosom. La nivel celular, patogeneza *Legionella* se datorează factorilor bacterieni care *blochează activarea fagocitelor.*

Legionella eliberează doi factori care inhibă activarea fagocitului:

- o *fosfatază* care blochează producerea intermediarilor reactivi ai O_2 (în special O_2^-), de către neutrofilele infectate. Fosfataza blochează formarea mesagerilor secundari şi astfel semnalul activator nu se propagă;
- *o citotoxină.*

Capacitatea invazivă a celulelor de *Legionella* sau supravieţuirea şi multiplicarea este favorizată de alţi factori: o proteină a suprafeţei – *Mip* (proteina care favorizează invazia monocitelor), *fosfolipaza C, o protein- kinază* care la *L. micdadei* catalizează fosforilarea substratului celulei gazdă (fosfatidil inozitolul din membrana citoplasmatică şi tubulina). Fosforilarea fosfatidil-inozitolului sau tubulinei poate fi unul dintre factorii de virulenţă, acţionând prin blocarea activării fagocitului.

Alte componente cu posibil rol de factori de virulenţă pot fi *LPS, proteina majoră a membranei externe, proteina de şoc termic* şi *o hemolizină*, denumită *legiolizina.*

In vitro, neutrofilele ingeră celulele de *L. pneumophila* tapetate cu anticorpi specifici şi complement, iar *L. micdadei* este ingerată numai în prezenţa serului uman ca sursă de complement opsonizant (nu necesită anticorpi specifici).

Neutrofilele, după ce fagocitează *L. micdadei*, par iniţial să funcţioneze normal, adică imediat după fagocitoză este activat metabolismul oxidativ. Fuziunea fagosomilor cu granulele primare (azurofile) şi secundare (specifice) este echivalentă interacţiunii cu *S. aureus*, utilizată ca probă de control pozitiv. Însă, la 30 de minute după fagocitoza *L. micdadei*, activarea neutrofilelor ca răspuns la stimulii solubili şi particulaţi este semnificativ depresată, comparativ cu cele care au ingerat *S. aureus* sau *E. coli*. Producerea O_2^-, ca şi chimiotaxia, fagocitoza şi activitatea bactericidă scad semnificativ, proporţional cu numărul de celule bacteriene fagocitate. Factorii care inhibă activitatea fagocitelor sunt eliberaţi de celula bacteriană, în condiţiile specifice din fagolizosom. Inhibiţia activităţii fagocitelor este produsă de celulele bacteriene vii sau omorâte. Probabil că bacteria întrerupe un proces timpuriu al activării celulare şi scapă distrugerii după fagocitoza mediată de neutrofile şi de monocite.

În *fagocitele alveolare*, obţinute prin lavaj bronho-alveolar, examenul electrono-optic a evidenţiat faptul că *Legionella* se multiplică rapid, astfel încât citoplasma se umple cu vezicule ce conţin bacterii şi celulele se lizează. Celulele bacteriene sunt localizate intracelular, în vacuole delimitate de membrane, tapetate cu ribosomi.

Legionella se multiplică în *macrofagele* cultivate *in vitro*, rezultatul fiind liza monostratului.

In vitro, *Legionella* este ingerată de amoebele din genurile *Acanthamoeba* şi *Naegleria*, care trăiesc în mediile naturale. Dinamica interacţiunii *Legionella* cu amoebele este omologă interacţiunii cu fagocitele umane. Celulele bacteriene sunt ingerate de amoebe în vezicule de fagocitoză şi, în condiţii favorabile, se multiplică până când celula amoebiană se dezintegrează. La amoebe, fagocitoza este nu numai un mecanism de apărare faţă de particulele şi celulele străine, ci este modalitatea principală de ingestie a hranei. Factorii de virulenţă pentru amoebe nu sunt aceiaşi cu factorii de virulenţă pentru fagocitele umane. Astfel, temperatura scăzută a mediului favorizează digestia celulelor de *Legionella* ingerate, iar temperatura mai mare favorizează infecţia şi multiplicarea *L. pneumophila* în amoebe.

Diferitele tulpini de *Legionella* se deosebesc prin modalitatea de a intra în fagocit şi prin evoluţia intracelulară: pentru a fi ingerată de neutrofile, *L. pneumophila* trebuie să fie opsonizată cu anticorpi specifici şi cu proteinele complementului derivate prin activarea pe calea clasică.

Majoritatea bacteriilor *Legionella* sunt înglobate prin fagocitoza convenţională, în cursul căreia bacteria este înconjurată de extensii ale pseudopodelor, până când extremităţile se întâlnesc şi fuzionează pe latura distală a particulei. Unele tulpini de *L. pneumophila* sunt însă ingerate de neutrofilele umane, de monocite şi de macrofagele alveolare, prin mecanismul *fagocitozei spiralate* (*coiling phagocytosis*): un pseudopod al fagocitului se spiralizează în jurul bacteriei, pe măsură ce celula este internalizată. Bacteria fagocitată se găseşte în centrul unei spirale mari, un fagosom tapetat cu ribosomi. Un astfel de fagosom nu fuzionează cu lizosomii monocitului (fig. 215).

Diferitele tulpini de *Legionella* eliberează un număr de enzime *proteolitice* şi *aminopeptidaze*. Unele rămân legate de celula producătoare, iar altele sunt secretate în mediul extracelular de cultivare, cu posibile funcţii de factori de virulenţă: *proteaze, fosfataze, fosfolipaza C.*

Aspectul *citoclastic* al infiltratului celular cu necroza neutrofilelor şi monocitelor se datorează *fosfolipazei C*. Fosfolipaza C acţionează asupra fosfatidil-colinei şi eliberează fosfatidil-colină şi diacil-glicerol. Deoarece fosfatidil-colina este un constituent important al membranei eucariote, acţiunea citolitică a fosfolipazei C poate leza atât celulele inflamatorii, cât şi ţesutul pulmonar.

Fig. 215. Fagocitoza spiralată a unei celule de *Legionella* de către un macrofag (http://louisville.edu/medschool/microbiology/graduate-program/microbial-pathogensis/multidisciplinary.html).

Legionella produce o varietate de *aminopeptidaze*. Fenilalanin-aminopeptidaza (izolată în stare pură) ar putea să hidrolizeze peptidele intracelulare ale gazdei.

SOD este ubicuitară la tulpinile de *Legionella*, în timp ce catalaza şi peroxidaza sunt caracteristici variabile.

Numărul mare de factori de virulenţă favorizează supravieţuirea celulei bacteriene în fagocite. *L. pneumophila* se multiplică în PMN până ce lizează celula gazdă, se eliberează şi infectează alte fagocite.

Legionella este un patogen oportunist: infectează femeile în timpul sarcinii, nou-născuţii, persoanele vârstnice, imunocompromise (pacienţii SIDA) sau debilitate. Infecţia este foarte frecvent asociată cu malignitatea (leucemii, limfoame, sarcoame), cu chimioterapia antineoplazică sau imunosupresoare (la persoanele cu transplant sau tratate corticosteroizi), cu hepatita cronică (ciroză sau alcoolism), cu insuficienţa renală, cu diabetul sau cu lupusul sistemic diseminat. Infecţia este de cele mai multe ori asimptomatică la toate grupele de vârstă, pacienţii imunocompetenţi supravieţuiesc legionelozei, dar la cei debilitaţi boala poate avea adeseori o evoluţie fatală. Manifestările clinice sunt mai frecvente după vârsta de 55 de ani. Factorii de risc sunt fumatul, bronşita cronică, emfizemul, tratamentul imunosupresor, chimioterapia antineoplazică, diabetul zaharat.

Legioneloza este o pneumonie acută cu o perioadă de incubaţie 2–10 zile, în care pacienţii prezintă un sindrom pseudogripal cu febră, tuse seacă, cefalee, mialgii, anorexie. În perioada de stare apare febră ridicată, dispnee şi tuse posibil expectorantă, uneori diaree şi alte semne nespecifice. Legioneloza este o pneumonie purulentă, caracterizată prin alveole încărcate cu neutrofile, macrofage, fibrină şi eritrocite.

Majoritatea celulelor de *L. pneumophila* sunt localizate în interiorul celulelor fagocitare. Aproximativ 85% din cazurile de legioneloză se datorează *L. pneumophila*, 50% din totalul proceselor infecţioase fiind produse de serogrupul 1, iar 10% de serogrupul 6.

Trăsătura caracteristică a exudatului este liza celulelor mediatoare ale procesului inflamator, polimorfonucleare şi macrofage, prezente în exudatul pulmonar, proces denumit *leucocitoclazie*. Majoritatea celulelor bacteriene se găsesc în interiorul celulelor fagocitare inflamatorii, în vacuole citoplasmatice delimitate de membrană (fagosomi), o proporţie mică fiind extracelulare (fig. 216).

Imaginile electrono-optice evidenţiază celule de *Legionella* în curs de diviziune. Nu se poate determina dacă bacteriile fagocitate s-au multiplicat intracelular sau au fost fagocitate după iniţierea extracelulară a procesului de diviziune.

Se crede că manifestările clinice depind de gradul de multiplicare intracelulară a *L. pneumophila*:

- numărul celulelor viabile de *L. pneumophila* obţinute prin lavaj pulmonar creşte rapid după infecţie;
- sensibilitatea unei specii la infecţia cu *L. pneumophila* se corelează cu capacitatea bacteriei de a se multiplica în macrofage;
- mutantele deficiente în capacitatea de creştere intracelulară, au virulenţă redusă.

Febra Pontiac se prezintă clinic cu aspect de sindrom gripal (febră, tuse, mialgie), fără pneumopatie. Bacteriile ajung în plămâni odată cu aerosolii, sunt fagocitate de către macrofagele alveolare, supravieţuiesc şi se multiplică în citoplasmă, blocând fuziunea fagosomului cu vacuolele lizosomale.

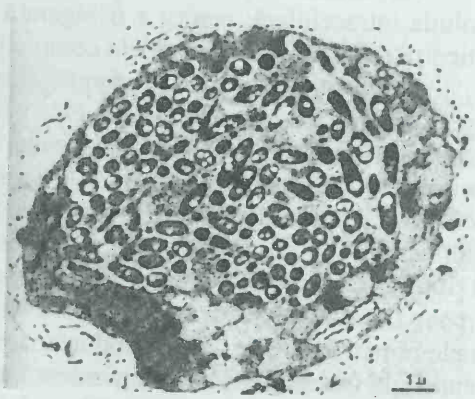


Fig. 216. Macrofag de hamster infectat cu *Legionella* (http://www.q-net.net.au/~legion/Rebecca_Traub_Legionella_Literature_Review.htm).

Macrofagul infectat se lizează. Nu s-a evidențiat contagiozitate (transmitere interumană). Nu este necesar tratamentul cu antibiotice, importante fiind măsurile de supraveghere a densității celulelor de *L. pneumophila* în rezervoarele naturale (care trebuie să fie mai mică de 10^3UFC/l).

Sursa agentului patogen infecțios este *apa contaminată*. *Legionella* crește în orice bazin de apă caldă, în prezența amoebelor și a altor bacterii. Dar agentul patogen nu trăiește liber în mediul acvatic. *In vitro*, *Legionella* infectează și se multiplică în amoebe și în protozoarele ciliate. Probabil infecția protozoarelor se produce și în condițiile mediului natural, acestea constituind sursa generatoare a agentului bacterian. *Legionella* conținută în celulele de *Amoeba*, în special în chiștii amoebieni, este deosebit de rezistentă la temperaturi extreme, clorinare etc. și intră în rețeaua de distribuție a apei. Turnurile de răcire și condensorii de evaporare pot fi contaminate cu *L. pneumophila*. Aerosolii care ies din aceste instalații disemnează bacteriile, care sunt inhalate și produc procesul infecțios la persoanele sensibile. Hiperclorinarea apei și supraîncălzirea pot fi factorii de control ai multiplicării *L. pneumophila* în apă și respectiv în sistemele de condiționare a aerului.

L. pneumophila se izolează prin cultivare din spălătura bronșică, din lichidul pleural, din biopsia pulmonară, din sânge. Izolarea din spută este îngreunată de numărul mare de bacterii ale microbiotei normale. Crește pe medii complexe, de exemplu BCYE (*buffered charcoal-yeast extract agar*) cu α-ketoglutarat +/– antibiotice, la pH 6.9, temperatura de 35°C și 90% umiditate, după 3 zile de incubare. Coloniile care apar după 24 de ore nu sunt *Legionella*. Coloniile au aspect pleomorf și pot fi transparente sau iridescente, roz sau bleu (fig. 217).

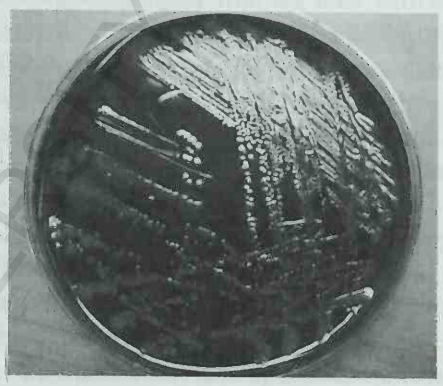


Fig. 217. Coloniil de *L. pneumophila* pe agar BCYE (http://www.emlab.com/s/sampling/env-report-01-2007.html).

L. pneumophila este considerată un patogen facultativ intracelular, deoarece se multiplică pe medii complexe de laborator. Este obligat aerobă, pozitivă pentru testul catalazei. Deși *L. pneumophila* hidrolizează amidonul și oxidează anumite glucide cu o rată scăzută, totuși metabolismul este de tip oxidativ, nu fermentativ. Cea mai mare parte a glucozei asimilate pare a fi folosită pentru a furniza precursori ai diferitelor căi de biosinteză.

Glucoza este metabolizată pe calea pentozo-fosfatului, rezultând pentoze pentru sinteza acizilor nucleici și a NADPH, ca potențial reducător pentru diferite căi biosintetice. Energia este eliberată prin oxidarea aminoacizilor pe calea ciclului acizilor tricarboxilici: serina, treonina și glutamatul sunt substraturi optime pentru *Legionella*. Acizii organici – lactatul, piruvatul, acetatul, malatul, fumaratul, oxalacetatul – sunt metabolizați (stimulează consumul de O_2). *Legionella* sintetizează acizii grași cu 14–17 atomi de C, în special cu catenă ramificată, predominant fiind izopalmitatul, un acid gras saturat, ramificat, cu 16 atomi de C. Pentru determinarea speciilor de *Legionella* poate fi folosită metoda cromatografiei gaz-lichid.

Pe frotiurile din probele clinice colorate Gram, *L. pneumophila* nu se poate evidenția. Se poate utiliza metoda fluorescenței directe, o metodă mai puțin sensibilă decât cultivarea. Tratamentul de elecție este eritromicina, sau pentru cazurile care nu răspund la tratament, rifampicina.

Bibliografie

1. http://louisville.edu/medschool/microbiology/graduate-program/microbial-pathogensis/multidisciplinary.html
2. http://www.emlab.com/s/sampling/env-report-01-2007.html
3. http://www.q-net.net.au/~legion/Rebecca_Traub_Legionella_Literature_Review.htm
4. Machner M. P., Isberg R. R. 2006. Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*. Dev Cell 11:47–56.
5. Machner M. P., Isberg R. R. 2007. A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation. Science 318:974–977.
6. Machner, M., Aldea M. R., Chen Y., Gaspar A., Thomas A. Modulation of Human Macrophages by the Intracellular Pathogen *Legionella pneumophila*. Ann. Report of the Division of Intramural Research.

4. BACILI GRAM POZITIVI SPORULAŢI. *FAMILIA BACILLACEAE*

Familia *Bacillaceae* cuprinde bacili sporulaţi, distribuiţi în două subdiviziuni: aerobi sau facultativ anaerobi din genul *Bacillus* şi anaerobi grupaţi în genul *Clostridium*. Reprezentanţii genului *Bacillus* sunt bacterii aerobe, componente ale microbiotei solului, în timp ce reprezentanţii genului *Clostridium* sunt bacili anaerobi din microbiota solului, din sedimente, din tractul intestinal animal. Bacilii celor două genuri sunt ubicuitari în sol, deoarece sporii rezistă ani de zile.

Majoritatea speciilor de *Bacillus* şi *Clostridium* nu sunt patogene, dar unele produc boli la om şi animale: *B. anthracis* produce antraxul la ierbivore şi accidental la om, fiind un agent important al bioterorismului şi al războiului biologic; *B. cereus* produce intoxicaţie alimentară şi infecţii oculare sau cu alte localizări; *C. tetani* produce tetanosul; *C. botulinum* produce botulismul; *C. perfingens* este agentul gangrenei gazoase, iar *C. difficile*, al colitei pseudomembranoase.

Reprezentanţii genului *Bacillus* sunt aerobi, sporulaţi (fig. 218), Gram pozitivi sau Gram variabili şi mobili prin flageli peritrihi. Sunt saprobionţi pe materia organică în descompunere (*B. cereus, B. subtilis*). Unele specii (*B. thuringiensis, B. popiliae, B. sphaericus, B. larvae*) sunt patogene pentru insecte. Datorită rezistenţei deosebite a sporilor la condiţiile de mediu, au o distribuţie foarte largă: în regiunile reci, dar şi în izvoarele fierbinţi, în nisipul deşertic, în apa dulce şi în sedimentele marine.

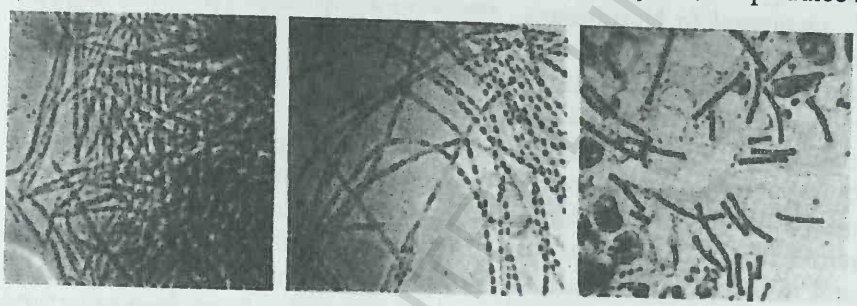


Fig. 218. Celule de *B. anthracis*, aşezate în lanţuri din culturi ale lui R. Koch în 1877 (citat de Todar, 2009).

Unele specii de *Bacillus* sintetizează antibiotice: bacitracina (*B. licheniformis, B. subtilis*), polimixina (*B. polymyxa*), gramicidina (*B. brevis*).

Sporii de *B. stearothermophilus* sunt utilizaţi pentru evaluarea metodelor de sterilizare a instrumentelor chirurgicale, a produselor farmaceutice şi ali29522mentare.

B. thuringiensis este utilizat în combaterea biologică a insectelor: toxina parasporală, de natură proteică, este toxică pentru epiteliul intestinal al larvelor de insecte defoliatoare (*Limanthria dispar*).

Speciile de interes clinic sunt *B. anthracis*, agentul antraxului şi *B. cereus*, care produce toxiinfecţii alimentare (tabelul 23).

Tabelul 23.

Caracterе diferenţiale ale speciilor de *B. anthracis, B. cereus* şi *B. thuringiensis*

	B. anthracis	*B. cereus* şi *B. thuringiensis*
Necesar de tiamină pentru creştere	+	–
Hemoliză*	–	+
Capsulă polipeptidică**	+	–
Liză mediată de bacteriofagul gamma***	+	–
Mobilitate	–	+
Creştere pe mediu hidrat de cloral (2,2,2-tricloro-1,1-etandiol)	–	+
String test	+	–

*Cultură hemolitică de *B. cereus* (stânga) şi de *B. anthracis* (dreapta) (Todar, 2009).

** Cultură mucoidă de *B. anthracis* (Todar, 2009).

**Liza culturii de *B. anthracis* mediată de bacteriofagul gamma (Todar, 2009).

8.1. *Bacillus anthracis*, agentul cauzal al antraxului, boală infecţioasă de prim ordin a ierbivorelor (capră, ovine, bovine, cal), este cel mai cunoscut reprezentant al genului *Bacillus*. Omul se infectează accidental, prin contactul cu animalele infectate sau cu produsele lor. La animale, poarta de intrare este cea digestivă, odată cu furajele contaminate. La om, sporii pătrund prin leziunile tegumentare (antrax cutanat), rareori prin membranele mucoase (antrax gastrointestinal) sau prin inhalare (antrax pulmonar).

Sporii germinează la locul de pătrundere şi induc apariţia unui edem gelatinos şi congestie. Bacilii se diseminează pe cale limfatică şi sanguină, se multiplică în sânge. Celulele necapsulate nu sunt virulente şi nu determină manifestări clinice. Cele capsulate sunt virulente şi induc antraxul clinic.

Virulenţa *B. anthracis* este condiţionată de doi factori:

- un polipeptid (poli-γ-D acid glutamic) din structura capsulei, care-l protejează de fagocite;
- toxină alcătuită din 3 componente proteice: *antigenul protector* (PA), *factorul letal* (LF) şi *factorul edematos* (EF).

Antigenul protector (se numeşte astfel, deoarece răspunsul imun faţă de acest component este protector pentru organismul uman şi animal) se leagă, probabil, de receptorii membranari şi este activat de o protează a celulei, după clivarea unei secvenţe de 20 kDa. Astfel este relevat un situs receptor secundar, pentru care intră în competiţia legării celelalte două componente (factorul letal şi factorul edematos). Complexele PA + LF sau PA + EF sunt internalizate prin mecanismul endocitozei mediate de receptor sub forma complexelor heptamerice. După acidifierea endosomului, subunităţile LF şi EF sunt eliberate în citosol.

Toxina de *B. anthracis* este analogă din punct de vedere funcţional cu toxina holerică, deoarece componentele EF şi LF au rolul componentei active (A), iar componenta PA are rolul de legare de receptorul membranar (B). Antigenul protector pare să formeze canale pentru trecerea ionilor prin membrana celulei eucariote.

Factorul edematos este o adenilat-ciclază dependentă de Ca^{2+}. O altă adenilat ciclază bacteriană intră în structura toxinei de *Bordetella pertussis*. Cele două toxine nu sunt înrudite antigenic (McBride şi Turnbull, 1999).

Factorul letal pare a fi o metaloprotează dependentă de Ca şi de Zn. Complexul LF şi PA determină leziunile tisulare, şocul sistemic şi moartea, mediate de nivelurile înalte de citokine.

Răspunsul imun anti LF şi EF nu este protector.

Patologie. Bacilul se multiplică la locul pătrunderii în organism. Capsula este chimiotactic negativă pentru fagocite şi rămâne intactă din punct de vedere structural, înconjurată de exudat vascular şi un număr mic de leucocite. De aici se diseminează în sânge (fig. 219).

La animalele rezistente, la locul multiplicării primare, bacilii induc afluxul masiv al leucocitelor, capsula se dezintegrează sub acţiunea factorilor litici din plasmă şi bacteriile sunt lizate.

Diagnostic. Bacilii se evidenţiază pe frotiul colorat, în fluidul din leziunea locală, în sânge şi în spută. Se observă lanţuri de bacili mari, imobili, Gram pozitivi.

Pe mediul geloză-sânge apar colonii gri-albicioase, rugoase, nehemolitice.

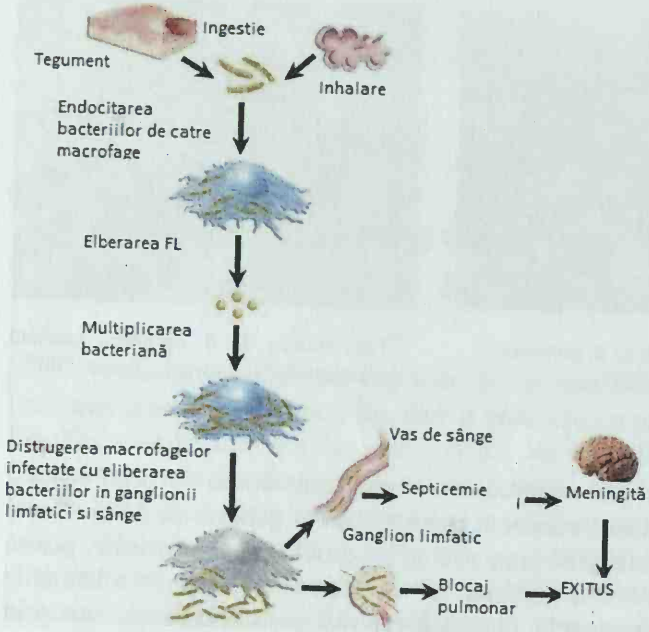


Fig. 219. Mecanismul patogenezei infecției cu *B. anthracis* (Dixon et al., 1999).

Metoda ELISA evidențiază anticorpii anti – EF şi LF. Serul se testează în faza acută şi la 4 săptămâni după infecție. Creşterea titrului de 4 ori sau titrul unic de 1/32 este considerat ca pozitiv.

Vaccinul de *B. anthracis* preparat de Pasteur a constat din tulpini bacteriene cultivate la temperaturi nepermisive (42–43°C), inhibitoare ale procesului de sporulare. Tulpinile cap^+/tox^- nu stimulează răspunsul imun protector, dar tulpinile cap^-/tox^+ sunt protectoare. O astfel de tulpină obținută de Stern (1937) constituie şi în prezent baza producerii vaccinului pentru animale, administrat sub forma sporilor viabili. Vaccinul are dezavantajul unei virulențe reziduale pentru speciile sensibile (capre, lame), dar virulența este mult atenuată în raport cu a tulpinilor sălbatice cap^-/tox^+. Polipeptidul materialului capsular este puțin antigenic şi nu pare să inducă un răspuns imun protector după administrarea vaccinului celular.

Vaccinul de uz clinic uman este un filtrat acelular absorbit cu hidroxid de aluminiu (ca adjuvant), al culturilor necapsulate, neproteolitice derivate dintr-o tulpină (V 770) originară dintr-un caz de antrax bovin.

8.2. *B. cereus* este un bacil mare, imobil, sporulat, aerob, Gram pozitiv. Celulele cu lungimea de 3–4 μm, cu capetele în unghi drept, sunt aşezate în lanțuri lungi. Este saprobiont în sol, apă, materialele vegetale. Se dezvoltă în alimente, unde secretă o *enterotoxină* şi produce intoxicația alimentară.

Intoxicația alimentară produsă de *B. cereus* prezintă două forme clinice distincte:

- *emetică*, asociată cu consumul orezului. *B. cereus* contaminează masiv culturile de orez. Sporii germinează în orezul din alimente, se multiplică şi produce enterotoxina în faza de creştere logaritmică sau în timpul sporulării;
- *diareică*, produsă de consumul cărnii. Perioada de incubare este de 1–24 de ore. Intoxicația este asociată cu diaree masivă.

Enterotoxina poate fi sintetizată nu numai în alimente, dar şi în lumenul intestinal.

B. cereus este component al microbiotei intestinale normale, astfel că prezența sa în scaun nu este suficientă pentru diagnostic. O densitate de 10^5 celule/g sau mai mare semnifică un dagnostic pozitiv.

Determinanții virulenței la B. cereus:

- *3 fosfolipaze C* (lecitinaza, fosfatidil-colin hidrolaza, fosfatidil-inozitol-hidrolaza). Fosfolipazele au acces la substratul fosfolipidic al membranei celulare în țesuturile care au suferit traumatisme. Deoarece lizează membrana eritrocitară, sunt hemolitice (fig. 220);
- *sfingomielinaza*, de asemenea hemolitică;
- *hemolizina I* (cereolizina), o citolozină termolabilă, activată de sulf. Situsul de legare al acestei citolozine pe membrana citoplasmatică este colesterolul. Interacțiunea hemolizinei I cu colesterolul produce microperforații membranare, care perturbă controlul echilibrului ionic. În sânge, hemolizina I este inactivată de colesterol, ceea ce limitează efectele patologice în infecțiile naturale;
- *hemolizina II*, alcătuită din două subunități (cea care mediază legarea şi cea activă). În infecțiile digestive naturale, hemolizina II are efecte necrotice asupra enterocitelor, ceea

ce explică stările diareice consecutive ingestiei alimentelor cu contaminare intensă. Activitatea sa nu este neutralizată de colesterol;

– *hemolizina III*, denumită factorul emetic, este o proteină sau un grup de proteine cu greutate moleculară mică, foarte stabile la căldură, la acțiunea proteazelor și la variația pH. Este un dodecadepsipeptid*.

* Depsipeptidele sunt polipeptide care conțin atât legături esterice, cât și peptidice. Depsipeptidele naturale sunt produse de către microorganisme, au în general structură ciclică și activitate antibacteriană (de exemplu, actinomicina, eniatina, valinomicina).

Fig. 220 B. cereus este intens hemolitic pe geloză sânge (http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english/).

8.3. *Genul Clostridium* cuprinde mai multe specii de bacterii din mediu sau componente ale microbiotei intestinale, responsabile de diferite entități clinice importante: *Cl. botulinum*, agentul botulismului, *Cl. tetani*, agentul tetanosului, *Cl. perfringens*, ce produce intoxicații alimentare, infecții anaerobe ale plăgilor, gangrena gazoasă și *Cl. difficile*, agentul colitei pseudomembranoase. Clostridiile sunt bacili sporulați, Gram pozitivi, mobili, a căror creștere are loc, de obicei, în condiții anaerobe (fig. 221, 222).

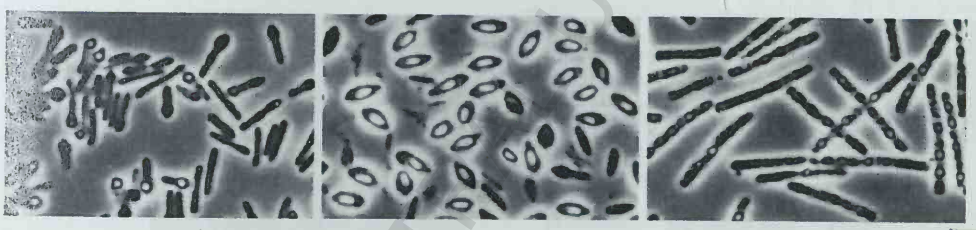


Fig. 221. Celule sporulate de *Clostridium* (Todar, 2009).

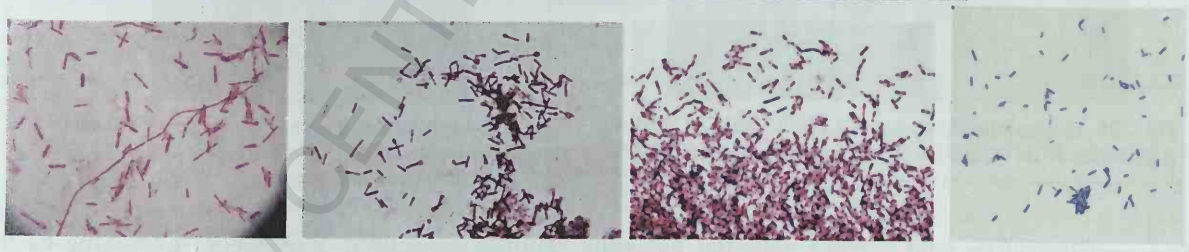


Fig. 222. Morfologia *C. botulinum, C. tetani, C. difficile* respectiv *C. perfringens*, nesporulat, pe frotiul colorat Gram (http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/strandwi_phil; http://microbiology2009.wikispaces.com/file/view/clostridium_tetani.gifhttp://sitemaker.umich.edu/mc5/files/clostridium_difficile.jpg, http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english/showmorf).

Tabelul 24.

Caracterele diferențiale ale diferitelor specii de *Clostridium* (Brook, 2008).

	C. perfringens	*C. septicum*	*C. novyi*	*C. difficille*	*C. tetani*	*C.botulinum*
Lecitinaza	+	–	+	–	–	–
Spor	subterminal	subterminal	central	subterminal	subterminal	terminal
Mobilitate	–	+	+	+	+	+
Beta hemoliză	+	+	+	–	+	+
Fermentarea glucozei	+	+	+	+	–	+
Reducerea nitraților la nitriți	+	+	+	–	–	–

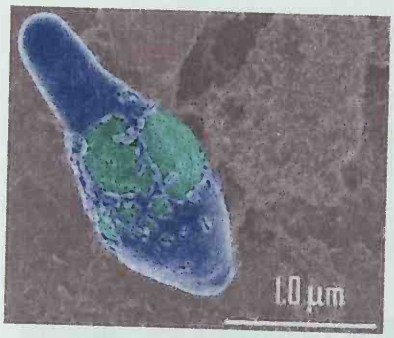


Fig. 223. Spor deformant de *Clostridium botulinum* (http://www.millennium-ark.net/NEWS/08_Health/08_Health_pics/081201.clostridium.jpg).

Clostridium se dezvoltă bine pe medii cu adaus de sânge. Sporii sunt deformanți, foarte rezistenți la temperatură înaltă și la variații extreme de pH, ceea ce le conferă capacitatea de supraviețuire pentru perioade lungi de timp, în sol (fig. 223).

Sunt bacterii saprobionte în sol sau în tractul intestinal al omului și animalelor. Se dezvoltă bine pe medii cu sânge și produc o zonă de hemoliză. Coloniile sunt mari (*C. perfringens*) sau mici (*C. tetani*) (fig. 224–227).

Clostridiile fermentează diferite glucide, descompun frecvent proteinele și sintetizează *toxine*. Laptele este coagulat cu producere de acizi (coagulare acidă), uneori cu producere de gaz care determină fragmentarea și deplasarea cheagului în masa mediului, sau este coagulat sub acțiunea proteazelor (coagulare dulce).

Fig. 224. Colonii de *C. septicum* pe geloză sânge (http://www.eol.org/pages/Clostridium_septicum)

Fig. 225. Colonii de *C: difficile* pe geloză sânge (http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0f/Clostridium_difficile_01.png)

Fig. 226. Colonii de 48 de ore de *C. botulinum* pe mediu cu gălbenuș de ou (http://www.biolib.cz/en/image/id27230/).

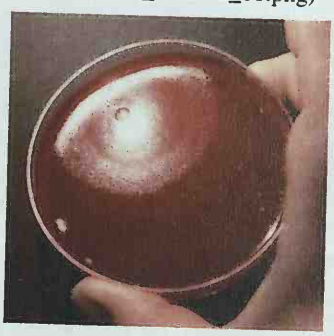


Fig. 227. Aspectul culturii de *C. tetani* pe geloză sânge (http://www.path.cam.ac.uk/partIB_pract/P27/P27_08-09v01asc.htm).

Clostridiile sunt bacterii potențial patogene, datorită capacității de a elibera exotoxine de o mare diversitate structurală. Multe specii de *Clostridium* eliberează mai mult decât o singură toxină, fiecare cu proprietăți imunogene proprii. De exemplu, s-au identificat 8 tipuri de tulpini de *C. botulinum* și 5 tipuri de tulpini de *C. perfringens*, fiecare tip eliberând toxine diferite din punct de vedere antigenic.

Toxinele clostridiene sunt asemănătoare din punct de vedere al structurii primare: omologia extinsă a aminoacizilor face ca între toxinele secretate de diferite tulpini să existe reactivitate imunitară încrucișată. Reacțiile imune încrucișate s-au înregistrat între toxinele de *C. difficile* și *C. sordelii* sau între toxina tetanică și toxina botulinică, care au mecanisme asemănătoare de acțiune.

Multe clostridii produc o varietate de enzime: colagenaze, proteaze, DN-aze, neuraminidaze, care măresc gradul de patogenitate a acestor bacterii.

Toxinele clostridiene se clasifică în 4 grupe, după efectul patologic major pe care-l produc (tabelul 25):

- *neurotoxine*: toxina tetanică (produsă de *C. tetani*), toxina botulinică (produsă de *C. botulinum*);
- *enterotoxine*: enterotoxina (eliberată de *C. perfringens* tulpini de tip A) produce intoxicația alimentară acută la om; tulpinile iota și ε de *C. perfringens* produc enterotoxemie la oi, viței, miei și cobai; *C. sordelii* produce o toxină hemoragică, asociată cu diaree la viței și oi;
- *histotoxine* sau toxine citolitice produse de unele tulpini de *C. perfringens*, agenții gangrenei gazoase și ai celulitei anaerobe;
- *citotoxine* (toxine ce acționează asupra citoscheletului), produse de *C. difficile*: toxinele A și B ce produc colita sau diareea asociate cu antibioticele la om sau tulburări diareice la animale. Toxinele care alterează citoscheletul produc ruperea actinei F (filamentoase) în celulele sensibile.

Multe dintre toxinele celor 4 grupări au și alte activități: toxina A de *C. difficile* este o enterotoxină puternică, ale cărei efecte au fost demonstrate pe ansa intestinală de iepure și de șobolan.

Tabelul 25.

Mecanismele de acțiune a unor toxine clostridiene.

Specia microbiană	Maladia produsă	Toxinele letale majore	Mecanismul toxicității
C. perfringens tip A	Gangrena gazoasă	Toxina α	Fosfolipaza C dependentă de Ca
C. perfringens tip C	Intoxicație alimentară	Enterotoxina	Modificări de permeabilitate
	Gangrena gazoasă	Toxina α	Fosfolipază dependentă de Ca
	Enterita necrotică	Toxina β	Citotoxină
C. septicum	Gangrena gazoasă	Toxina α	Hemolizină, citolitică
C. novyi tip A	Gangrena gazoasă	Toxina α	Citotoxină
C. sordelii	Gangrena gazoasă	Toxina letală	Citotoxină
	Diaree hemoragică	Toxina hemoragică	Citotoxină, enterotoxină
C. tetani	Tetanus	Tetanospasmina	Neurotoxină, clivajul sinaptobrevinei
C. botulinum tip A, B,	Botulism	Toxina botulinică C1, D, E, F, G	Neurotoxină, clivajul sinaptobrevinei
C. difficile	Diaree și colită	Toxina A	Citotoxine, ruperea filamentelor de actină
	Colită pseudomembranoasă asociată cu administrarea antibioticelor	Toxina B	

C. botulinum trăiește în sol și ocazional în fecalele animalelor. Factorul de virulență este toxina botulinică. S-au identificat 8 variante serologice: A, B, C_1, C_2, D, E, F, G, dar efectele farmacologice sunt asemănătoare.

Uneori, tulpinile de *C. botulinum* produc nu numai toxina specifică de tip, ci și o cantitate mică de toxină specifică altui tip (Ab, Af, Ba și Bf).

Toxina botulinică este una dintre cele mai toxice substanțe: doza letală pentru om este 1 μg. Toxina este inactivată la 100°C, în 20 de minute.

Toxina botulinică aparține grupului toxinelor neuroparalitice și are un potențial toxic extrem de ridicat.

Tipurile A, B, E și F produc cele mai frecvente cazuri de botulism la om, iar tipurile C, D și E la animalele domestice și sălbatice. Tipul G s-a izolat din sol, dar nu a fost determinat drept cauză a

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

botulismului la om sau la animale. Toate tulpinile producătoare de neurotoxină botulinică (A-F) produc lipază, detectată ca o zonă iridescentă care înconjură colonia pe mediul cu gălbenuş de ou. *C. botulinum* care produce toxina de tip G nu produce lipază şi nu fermentează glucidele.

Toxina botulinică este intracelulară şi este eliberată după liza mecanică sau enzimatică a peretelui celular. Tulpinile bacteriene neproteolitice produc toxine de tip C, D, E şi G, care îşi exprimă întregul potenţial toxic numai în prezenţa tripsinei. Tripsina clivează molecula de toxină în două polipeptide, care se separă după reducerea punţii S-S. Activarea toxinei botulinice poate avea loc în tractul intestinal, sub acţiunea enzimelor proteolitice, înainte de absorbţia în sânge.

Toxina de tip A a fost purificată şi cristalizată ca un complex cu greutate moleculară de 900 kDa, format din neurotoxina de 120–150 kDa şi o hemaglutinină, căreia i se atribuie rol protector faţă de enzimele tractului digestiv, înainte de absorbţia în fluxul sanguin. Neurotoxina este sensibilă la enzimele digestive şi la pH acid. Din această cauză, toxina în stare nativă, necomplexată, nu poate să producă intoxicaţia.

Toxina E este produsă sub forma unui complex format din neurotoxină şi câteva componente netoxice, cu greutate moleculară de 350 kDa.

Tulpinile bacteriene proteolitice au o enzimă asemănătoare tripsinei, care activează toxina.

Botulismul este cauzat de ingestia alimentelor conservate, care conţin toxina preformată, sintetizată de *C. botulinum*. Cazurile de botulism asociate cu rănirea se datorează multiplicării bacteriei în ţesutul lezat şi producerii toxinei. Perioada de incubaţie, prelungită între momentul ingestiei alimentului suspectat şi apariţia simptomelor, a generat teoria toxiinfecţiei: *C. botulinum* ingerat se multiplică în tractul intestinal şi eliberează toxina.

Diagnostic. Toxina botulinică se evidenţiază în serul pacienţilor şi în alimente. Injectarea probei contaminate la şoareci produce efecte letale imediate. În cazurile de botulism infantil, toxina se evidenţiază în colon, dar nu în ser.

Tratament. Serul imun trivalent faţă de cele 3 serotipuri de toxină botulinică (A, B, E) se obţine pe cal şi se administrează imediat, intravenos. Rata mortalităţii s-a redus semnificativ.

C. tetani este un bacil mobil prin flageli, răspândit în sol şi în materialele fecale ale animalelor, în special de cal. Celulele vegetative ale tuturor tulpinilor izolate au antigen somatic O comun şi toate produc acelaşi tip antigenic de neurotoxină, *tetanospasmina*.

Ca şi *C. botulinum, C. tetani* nu este invaziv. Infecţia rămâne strict localizată în aria de ţesut devitalizat (răni, arsuri, suturi chirurgicale, resturi de cordon ombilical) contaminate cu spori din mediul extern. Sporii germinează în ţesutul devitalizat la un potenţial redox de +10 mV (potenţialul redox al ţesutului normal este de +120 mV), iar celulele vegetative sintetizează *tetanospasmina* pe care o eliberează prin autoliză. Infecţia localizată este adeseori nesemnificativă clinic. Toxina se răspândeşte prin filetele nervoase, în neuronii din măduvă şi trunchiul cerebral, prin transport axonal retrograd.

Perioada de incubaţie este de la 4–5 zile, până la mai multe săptămâni. Boala este o *toxemie* şi constă în paralizia muşchilor striaţi în stare de *contracţie tetanică*. Traumele severe creează condiţii predispozante pentru tetanos, dar peste 50% din cazuri sunt consecutive leziunilor minore. Moartea este consecinţa paraliziei muşchilor respiratori. Rata mortalităţii este foarte înaltă.

Tetanosul este o boală care se poate preveni integral prin administrarea vaccinului reprezentat de *anatoxina tetanică* (toxina detoxifiată sub acţiunea formolului), adsorbită pe săruri de aluminiu (hidroxid de Al, fosfat de Al), cu rol de adjuvanţi.

Cl. botulinum. Sporii din mediul extern ajung în alimentele conservate cu nivel scăzut al O_2. Sporii germinează şi celulele vegetative produc toxina. Toxina este termolabilă, astfel că alimentele tratate termic nu transmit botulismul. Toxina preformată este ingerată, se absoarbe la nivel intestinal şi acţionează asupra terminaţiilor nervoase periferice. Efectul este inhibiţia eliberării mediatorului sinapselor colinergice şi *paralizia flască* a muşchilor striaţi.

Structura. Neurotoxinele botulinice şi tetanospasmina sunt sintetizate ca polipeptide unice, clivate de proteaze bacteriene în cele 2 subunităţi, de 50 respectiv 100 kDa, dar rămân legate printr-o punte S-S.

Mecanismul de acţiune este *proteolitic*, comun, atât pentru toxina botulinică, cât şi pentru tetanospasmină. Indiferent de modul în care toxina botulinică dobândeşte acces în organism (ingestia toxinei preformate sau producerea ei într-o rană sau în tractul gastrointestinal), *mecanismul de acţiune este identic*. Toxina se leagă de receptorii terminaţiilor nervoase periferice şi este internalizată printr-un mecanism necunoscut (fig. 228). Subunitatea mică a toxinei botulinice este litică pentru proteinele neuronale ţintă SNARE (sinaptobrevina, SNAP 25 şi sintaxina (Brooks şi colab., 2007) şi blochează eliberarea acetilcolinei la nivelul sinapsei, efectul fiind absenţa contracţiei şi *paralizia flască* a muşchilor striaţi.

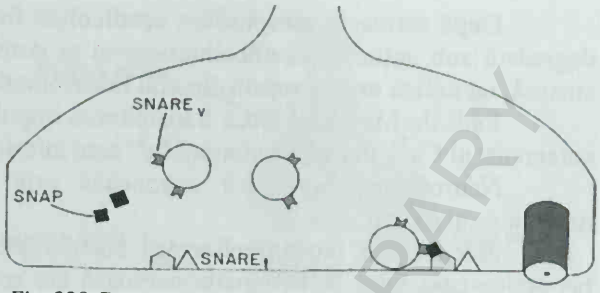


Fig. 228. Reprezentarea componentelor butonului presinaptic: SNAP = proteină asociată sinaptosomului; SNAREv = vezicule cu mediatori sinaptici; SNARE = receptori ai membranei presinaptice; cilindrul reprezintă canalul de Ca.

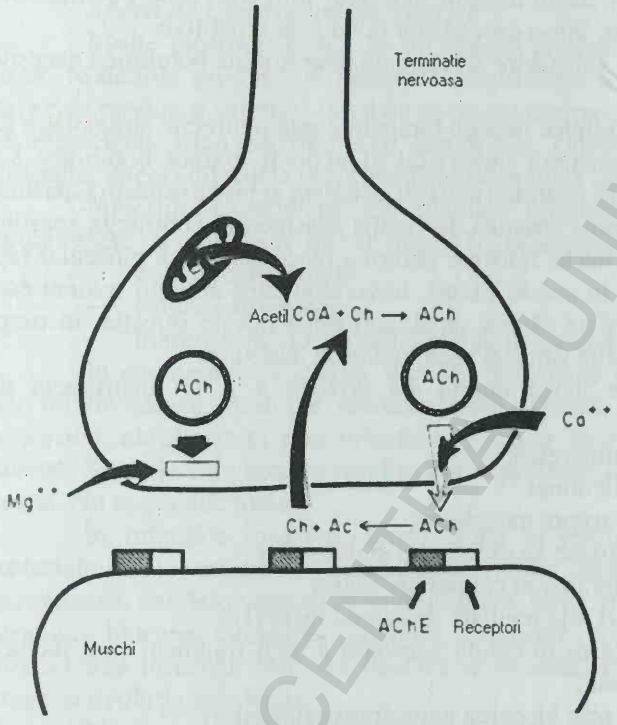
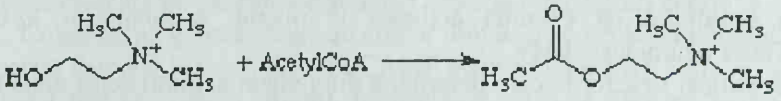


Fig. 229. Ilustrarea schematică a metabolismului acetilcolinei la joncţiunea neuromusculară.

Toxina botulinică se deosebeşte de tetanospasmină, prin aceea că acţionează *periferic*: se fixează la nivelul sinapselor neuroefectoare şi blochează transmiterea impulsului (fig. 229), producând *paralizia flască* a muşchilor dependenţi de sistemul nervos vegetativ, care interferă cu respiraţia şi produc asfixia. Toxina acţionează specific asupra sistemului nervos periferic. SNC nu pare să fie afectat, probabil datorită barierei sânge-creier sau datorită lipsei receptorilor pentru toxină.

Toxina botulinică se leagă specific la joncţiunea neuro-musculară şi produce paralizia completă a fibrelor nervoase colinergice. Acetilcolina este mediatorul următoarelor trei tipuri de fibre: terminaţiile fibrelor preganglionare simpatice şi parasimpatice; terminaţiile postganglionare parasimpatice; terminaţiile ce inervează muşchii striaţi. Toxina botulinică pare să paralizeze numai sinapsele care au ca mediator acetilcolina.

Acetilcolina este sintetizată în terminaţia nervoasă presinaptică, din acetatul derivat din acetil-coenzima A şi colina de origine alimentară. Legarea lor este catalizată de colin-acetiltransferază. După sinteză, acetilcolina este depozitată în vezicule. Impulsul nervos induce influxul Ca^{2+} şi efluxul veziculelor cu acetilcolină. Acetilcolina este eliberată prin procese de exocitoză în fanta sinaptică şi se leagă de receptori.



Colina Acetilcolina

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

După activarea receptorilor, acetilcolina fie difuzează spre membrana post-sinaptică, fie este degradată sub acțiunea acetilcolinesterazei și convertită la acetat și colină. Acetatul difuzează din sinapsă, iar colina este pompată din nou în terminația presinaptică pentru reutilizare.

Ionii de Mg^{2+} pot bloca transmiterea impulsului la sinapsa colinergică, deoarece Mg este un antagonist al Ca^{2+}, dar concentrația Mg^{2+} este inferioară și transmiterea nu este blocată.

Neurotoxina botulinică acționează prin *blocarea eliberării acetilcolinei* la joncțiunea neuromusculară.

Mecanismul blocării eliberării acetilcolinei s-a elucidat recent: porțiunea activă a toxinei botulinice care intră în terminația nervoasă are activitate *peptidazică* specifică pentru proteinele ce formează structurile *veziculare* ce conțin mediatorul sinaptic (acetilcolina) și au rol în exocitoză. Acțiunea toxinei împiedică exocitoza mediatorului sinaptic și propagarea potențialului de acțiune.

Perioada de incubație este dependentă de doză: câteva ore până la câteva zile, după care apar dificultăți ale actului deglutiției și respirației, diplopie, paralizia extremităților. Rata mortalității este mare. Pacienții care se recuperează nu sintetizează anticorpi specifici anti-toxină.

Antiserul specific administrat timpuriu, înainte ca toxina botulinică să se fixeze pe receptorii țesutului nervos, se folosește în scop terapeutic. *Guanidina*, administrată în scop terapeutic, acționează presinaptic și stimulează eliberarea acetilcolinei din terminațiile nervoase, iar monoacetatul germinal (din semințe încolțite) acționează postsinaptic și crește tonusul muscular prin conversia potențialului unic de acțiune cauzat de un singur impuls nervos, într-o cascadă de potențiale repetitive.

Recuperarea funcției nervoase la nivelul sinapselor afectate de neurotoxina botulinică necesită formarea unor noi plăci neuromotorii.

Utilizarea acțiunii selective a toxinei botulinice în scop terapeutic este o direcție atrăgătoare de investigație farmacologică. Specificitatea și caracterul ireversibil al acțiunii toxinei botulinice s-a folosit cu succes pentru tratamentul unor afecțiuni neuromusculare: strabism și blefarospasm (spasmul mușchilor pleoapelor), spasmul hemifacial, disfonia spastică, torticolis spasmodic (contracția spastică a mușchilor gâtului). Cantități foarte mici de toxină se folosesc pentru a bloca răspunsul muscular față de impulsurile nervoase care produc disfuncții. În aceste cazuri, ireversibilitatea acțiunii toxinei este ideală, deoarece efectul terapeutic poate să persiste câteva săptămâni după fiecare injecție. În timp, efectele terapeutice ale toxinei sunt anulate, datorită sintezei proteinelor de înlocuire.

Toxina botulinică, datorită acțiunii de lungă durată s-a dovedit a fi un instrument de investigație în trei domenii de cercetare:

- localizarea terminațiilor nervoase colinergice;
- studiul mecanismului eliberării acetilcolinei;
- analiza efectelor trofice ale nervilor asupra mușchilor.

Mecanismele de acțiune ale celor două toxine au asemănări și deosebiri:

- ambele se leagă pe un receptor membranar al celulei nervoase;
- legarea celor două toxine de receptori este mediată de catena mare (H);
- treapta paralitică necesită internalizarea în celula nervoasă a unui fragment care include catena ușoară sau o secvență a acesteia;
- ambele produc disfuncții musculare prin blocarea neurotransmițătorilor;
- toxina tetanică acționează la nivelul *centrilor nervoși* din măduva spinării și din trunchiul cerebral. Se leagă de receptorii de pe membrana sinaptică a neuronilor somatomotori și migrează în pericarionii din măduva spinală și din trunchiul cerebral, prin transportul axonal retrograd. Toxina difuzează spre prelungirile *celulelor inhibitorii ale transmiterii potențialului de acțiune*: neuronii de asociație ai căror mediatori sinaptici sunt *glicina și acidul gama-aminobutiric* (GABA). Toxina tetanică degradează sinaptobrevina, proteina care mediază legarea veziculelor cu mediatori de membrana presinaptică a neuronilor inhibitori. În absența mediatorilor inhibitori, eliberarea acetilcolinei este necontrolată, rezultatul fiind *paralizia spastică* (în contracție tetanică) a mușchilor striați;
- toxina botulinică își exercită acțiunea la nivelul *terminațiilor nervoase periferice* (joncțiunea neuromusculară);

Nu s-au identificat structurile care determină diferențele acțiunii celor două toxine (fig. 230). Omologia aminoacizilor în cele două catene ale celor două toxine este remarcabilă. Se consideră că genele codificatoare au evoluat dintr-o genă ancestrală comună.

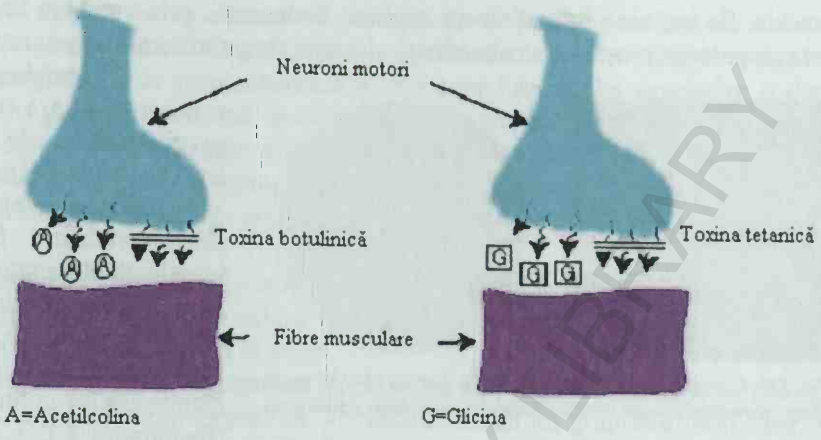


Fig. 230. Prezentarea schematică comparativă a modului de acțiune a toxinelor botulinice și tetanică. Toxina botulinică blochează eliberarea acetilcolinei din butonul presinaptic și produce paralizia flască, iar toxina tetanică blochează eliberarea GABA, mediatorul inhibitor al propagării impulsurilor la nivelul sinapsei și produce paralizia spastică.

Toxina tetanică și cea botulinică de tip G sunt codificate de gene plasmidiale; toxinele C și D botulinice sunt codificate de gene fagice.

Specii de Clostridium histotoxice

Multe clostridii (circa 30 de specii) produc infecții invazive dacă sunt inoculate în țesutul lezat. Maladiile produse de infecțiile clostridiene se datorează producerii *exotoxinelor.* Clostridiile invazive produc o varietate largă de toxine și enzime, care favorizează diseminarea infecției. Toxinele au efect letal, fiind necrozante și hemolitice. Uneori, efectele sunt produse de entități moleculare distincte, alteori diferitele proprietăți sunt cumulate de aceeași moleculă.

Infecțiile clostridiene ale plăgilor (produse prin leziuni tisulare mecanice profunde și contaminate cu granule de sol) se împart în 3 categorii:

- contaminări simple
- celulita anaerobă
- mionecroza clostridiană (gangrena gazoasă).

În *contaminările simple*, una sau mai multe specii de *Clostridium* se găsesc în țesutul lezat, dar nu invadează țesuturile înconjurătoare. Uneori progresează la condiția patologică de *celulită anaerobă*, caracterizată prin infecția și necroza țesutului traumatizat, fără ca țesutul sănătos să fie afectat. Speciile care produc celulita pot fi proteolitice și din această cauză, rana poate avea culoarea brună. Nu se produc toxine.

În infecțiile invazive, sporii ajung în țesuturi fie prin contaminarea (cu granule de sol, materiale fecale) țesuturilor traumatizate, fie din tractul intestinal. La potențialul redox scăzut, sporii germinează, celulele vegetative se multiplică, fermentează glucidele tisulare și produc gaze. Distensia țesutului, blocarea circulației sanguine, producerea toxinelor necrozante și hialuronidazei favorizează diseminarea infecției. Necroza tisulară se extinde, anemia hemolitică progresează, nivelul toxemiei crește și evoluția este letală.

Mionecroza (gangrena gazoasă) implică invazia mușchiului sănătos, care nu fusese avariat de traumă sau de ischemie. În stadiul terminal se instalează starea de prostrație, apatie, șocul ireversibil. Probabil, moartea se datorează intoxicației cronice și efectului direct al toxinelor asupra organelor vitale. Cele mai multe mionecroze sunt produse de *C. perfringens*, *C. novyi* și *C. septicum.* Nici una dintre specii nu este foarte invazivă. De fapt aceste specii sunt saprobionte, dar produc toxine necrozante, *lecitinazice* și *hemolitice.* În leziunile mionecrotice infecția este întotdeauna mixtă, cu clostridii toxigene, proteolitice, diferiți coci și bacterii Gram negative.

Cel mai comun invaziv este *C. perfringens* (denumirea veche – *C. welchii*), component al *microbiotei* intestinale a omului și animalelor și a tractului genital la 5% dintre femei. Sporii sunt rari și nu apar în culturile crescute pe mediile obișnuite. Crește la temperaturi cuprinse între 20 și 50°C, cu un optim la 45°C. Coloniile pe geloză-sânge au contur dublu: o zonă clară internă datorată toxinei θ și o zonă externă neclară datorată toxinei α (testul CAMP pozitiv) (fig. 231).

Este un bacil imobil, reduce nitratul, fermentează glucoza, lactoza, manoza, sucroza etc. și lichefiază gelatina. Lactoza din lapte este fermentată cu coagulare și producere de gaz, dar nu digeră

cazeina. Se izolează uşor dintr-un amestec de bacterii, prin incubare la 45°C (t° optimă de creştere), ceea ce permite creşterea sa abundentă, datorită timpului scurt de generaţie (8 min).

Fig. 231. C. perfringens – hemoliza dublă şi testul CAMP pozitiv (http://www.graphicshunt.com/health/images/ clostridium_perfringens).

C. perfringens produce 4 toxine letale majore (α, β, ε, ι (iota)), pe baza cărora speciile se grupează în cele 5 tipuri toxigene: A, B, C, D, E. Alte 9 toxine minore (antigene solubile) pot avea rol în patogeneză: δ, θ, k, λ, μ, ν, γ, eta şi *neuraminidaza*. *Enterotoxina* poate cauza intoxicaţii alimentare.

Cele mai importante pentru infecţiile de plagă sunt tulpinile *grupului A*, prezente în sol şi în conţinutul intestinal uman şi animal, în absenţa manifestărilor clinice. Ele produc toxina α (fosfolipază C), *k* (colagenază), θ (hemolizină), λ (protează) şi ν (*nu*) (DN-ază). Tipurile B, C, D, E nu supravieţuiesc în sol şi par a fi obligat parazite. Se găsesc în tractul intestinal al animalelor domestice, iar prezenţa acestor tipuri la om este asociată cu boala.

Cea mai importantă toxină produsă de tulpinile A de *C. perfringens* este *toxina* α. Este o *fosfolipază C* (o lecitinază dependentă de Ca), o metaloprotează cu Zn, de 53 kDa, ce hidrolizează lecitina, componentă majoră a membranei citoplasmatice şi de asemenea, complexele fosfolipidice sanguine, eliberând fosforil-colină şi digliceride. α-toxina determină reacţia pozitivă pentru lecitinază pe mediul cu gălbenuş de ou şi produce o hemoliză incompletă pe geloză-sânge.

In vivo, α-*toxina* produce hemoliza intravasculară, agregare plachetară, leziuni capilare, liza leucocitelor, hipotensiune şi bradicardie, rezultatul final fiind adeseori şocul toxic. Ionii de Ca, care condiţionează activitatea fosfolipazei C, pot avea rolul de a conferi sarcină pozitivă miceliilor de lecitină. Activitatea toxinei este inhibată de fosfat sau de alte substanţe care leagă Ca. Activităţile hemolitică şi hidrolitică ale fosfolipazei C s-au disociat prin încălzire la 56°C, în prezenţa ionilor de Ca. Activitatea hemolitică este inhibată, iar cea hidrolitică se păstrează. Este factorul major al mionecrozei (gangrena gazoasă).

Toxina-β este o toxină letală majoră produsă de tulpinile B şi C de *C. perfringens*, responsabilă de leziunile enteritei necrotice la pacienţii cu un nivel scăzut al dietei proteice. Pacienţii au nivel scăzut al activităţii proteazelor digestive, acestea fiind blocate de inhibitorii din cartoful consumat tradiţional în cantităţi mari la sărbătorile din Noua Guinee, împreună cu carnea de porc cu rol de sursă a agentului infecţios.

Toxina-ε este produsă de tulpinile de tip B şi D. Este sintetizată ca o protoxină cu toxicitate minimă, convertită la forma de peste 1000 de ori mai activă după clivarea proteolitică a secvenţei N-terminale, sub acţiunea proteazelor bacteriene sau a tripsinei. Protoxina conţine 311 aminoacizi. Activarea protoxinei corespunde ruperii legăturii peptidice între aminoacizii 14–15 de la capătul N şi eliberarea "peptidului de activare" de 14 aminoacizi.

Toxina lezează în primul rând intestinul, producând creşterea permeabilităţii peretelui intestinal, cu creşterea înglobării toxinei, care acţionează sistemic şi îşi exercită efecte letale. După intrarea în circulaţie produce hiperemie renală, edem pulmonar, exces de lichid pericardic.

Toxina iota este sintetizată de tulpinile E de *C. perfringens* izolate din intestinul de viţel cu semnele enteritei şi ale intoxicaţiei generale. Este alcătuită din două proteine, distincte biologic şi imunologic (iota-a şi iota-b). Activitatea toxică este produsă de amestecul celor două proteine. Iota-b are rol de legare, iar iota-a pătrunde în citosolul celulelor sensibile: actina globulară a muşchilor striaţi şi actina nemusculară sunt ADP-ribozilate. Este dermonecrotică şi letală pentru şoarece.

C. perfringens poate produce *enterotoxemia** la om şi animale, după ingestia unui număr mare de celule vii sau după ingestia alimentelor contaminate. Se multiplică în intestin şi enterotoxina atinge repede un nivel suficient de crescut pentru a fi absorbită în sânge. Enterotoxemia este produsă de enterotoxine, β-toxină şi toxina ε. Ultima măreşte permeabilitatea intestinală, ceea ce permite absorbţia rapidă a toxinei din lumen. Are afinitate mare pentru ţesutul nervos şi rinichi, unde produce edem şi necroză.

* Enterotoxemia este consecutivă creşterii accentuate a permeabilităţii barierei intestinale, consecinţa fiind tranzitul unei cantităţi crescute de toxine, din lumen, în mediul intern.

Enterotoxemia asociată cu intoxicația alimentară produsă de *C. perfringens* are un caracter particular, deoarece toxina nu se sintetizează în timpul creşterii vegetative, ci numai în timpul sporulării. Toxina se acumulează în sporangiul celular şi se eliberează numai după liza celulei vegetative şi după eliberarea sporului matur. Toxina pare a fi o proteină structurală a învelişului sporal.

În cele mai multe cazuri de intoxicații alimentare, se consideră că celulele vii de *C. perfringens* sunt ingerate odată cu alimentele, ajung în intestin, sporulează şi se lizează eliberând enterotoxina. Argumentul major împotriva toxinei preformate este că, în produsele alimentare, bacteria sporulează puțin sau deloc.

Tulpinile de *C. perfringens* care sintetizează toxina β în cantitate mare sunt asociate cu *enterita necrozantă.* Toxina produce paralizia locală a mişcărilor intestinale, urmată de inflamație, hemoragie, necroză gangrenoasă focală, în special în jejun.

Enterotoxina (CPE) este o proteină oligomerică de 35 kDa, cu punctul izoelectric la pH 4,3, produsă de tulpinile de tip A, C şi D. Este un peptid cu 309 amioacizi, cu un grup sulfhidril liber. În anumite condiții CPE formează un complex de cca 155 kDa, care ar corespunde unui por ce alterează permeabilitatea membranei. Activitatea enterotoxinei creşte de câteva ori după tratamentul cu tripsină. Tripsina clivează toxina, la două situsuri, fiecare cu un rest de lizină, rezultând două peptide de 15 şi respectiv de 10 aminoacizi. Toxina tripsinizată constă dintr-o catenă de 284 de aminoacizi şi cele două peptide asociate, care nu se separă de catena majoră decât în prezența SDS. Aminoacizii din regiunea 45–116 sunt esențiali pentru activitatea toxinei, mediind interacțiunea acesteia cu ocludina, o proteină de 65 kDa situată la nvielul joncțiunilor strânse. Receptorii sunt necunoscuți.

Modul de acțiune a enterotoxinei de *C. perfringens* este asemănător cu al enterotoxinei holerice şi al enterotoxinei β de *Staphylococcus* sp.: produce creşterea permeabilității capilarelor, vasodilatație şi creşterea motilității intestinale.

Enterotoxina se leagă de receptorii de suprafață ai celulelor epiteliale intestinale. Legarea este urmată de inserția întregii molecule în membrană, fără internalizare. Se produce o schimbare bruscă a fluxului ionic, care influențează metabolismul şi sinteza macromoleculelor, creşte nivelul Ca^{2+} intracelular, iar transportul apei, Na şi Cl este inversat, de la absorbție spre secreție. Se pierde lichidul celular, ionii şi moleculele de până la 3,5 kDa. Toxina are activitate maximă în ileon, moderată în jejun şi este inactivă în duoden.

În infecțiile cu *C. perfringens*, rolul fundamental în patogeneză îl are *fosfolipaza C*. Colagenaza, proteaza nespecifică, hemolizina şi DN-aza produc modificări ale țesutului infectat. Acțiunea toxinelor produce *edemul*, care diminuează fluxul sanguin şi potențialul redox al țesutului, urmat de necroză. Aceste modificări uşurează creşterea agentului infecțios şi răspândirea infecției în țesutul înconjurător.

Neuraminidaza (sialidaza) este un factor de patogenitate al multor microorganisme. Acțiunea sa asupra eritrocitelor le face aglutinabile, creşte vâscozitatea sângelui şi favorizează tromboza capilară. Este formată dintr-un singur lanț polipeptidic de 64 kDa. La isoelectrofocusare se relevă 5 componente, fiecare cu pH izoelectric distinct. După denaturare cu SDS sau uree 8M, diferențele dispar şi polipeptidul are pH izoelectric la 4,3.

Pentru *diagnostic*, se analizează materialele din leziune: puroi, țesut necrozat. Prezența bacililor mari Gram pozitivi sugerează clostridiile gangrenei gazoase. Sporii nu sunt întotdeauna prezenți. Materialul din leziune se inoculează pe mediul *chopped meat*-glucoză cu tioglicolat (pentru anaerobi) şi pe plăci cu geloză-sânge. Cultura se transferă în mediu cu lapte. Coagularea cu producere intensă de gaz în 24 ore este revelatoare pentru *C. perfringens* (232).

Fig. 232. Aspectul culturii de 48 de ore de *C. perfringens* pe mediu cu gălbenuş de ou (Nagler). Apariția precipitatului indică activitatea lecitinazică (http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/Clostridium perfringens).

Identificarea finală constă în evidențierea toxinei şi neutralizarea ei în prezența anticorpilor specifici.

C. novyi (*C. oedematiens*) se întâlneşte cu o frecvență de 40–60% în rănile infectate şi este asociat cu gangrena gazoasă. În funcție de capacitatea de a produce diferite toxine, tulpinile sale aparțin la 3 grupe toxigenice: A, B, C.

Cele două specii produc toxine, unele cu specificități antigenice comune, neputând fi distinse pe baze serologice.

C. septicum produce o maladie a oilor denumită *braxy**, caracterizată prin infecția mucoasei şi a submucoasei abomasum, multiplicare cu bacteriemie şi toxemie fatală în câteva ore de la apariția simptomelor.

* Braxy este o maladie acută, de obicei fatală, a mieilor şi oilor tinere, ale cărei simptome sunt febra, anorexia, inflamația peretelui abomasum şi toxemia. Maladia apare numai iarna şi se poate datora invaziei abomasum cu *Cl. septicum*. Ingestia vegetalelor înghețate este un posibil factor predispozant. Moartea survine în câteva ore de la apariția simptomelor.

C. histolyticum este o bacterie comună în sol, rareori asociată cu gangrena gazoasă în etiologie unică, dar care poate fi implicată în asociație cu *C. perfringens* în etiologia gangrenei gazoase. Produce colagenaze şi alte enzime proteolitice, unice prin eficiența lor de a hidroliza proteinele tisulare până la peptide şi aminoacizi. Frecvența redusă a izolării s-ar putea datora dificultăților de cultivare. Nu este strict anaerob (creşte pe mediile agarizate chiar în prezența aerului), dar este inhibat de glucoza din mediu, iar rezistența termică a sporilor este redusă. Nu fermentează glucidele, dar este proteolitic. Nu formează alți acizi, cu excepția acidului acetic.

C. histolyticum produce cel puțin 5 toxine-enzime:

- α-*toxina* necrozantă şi letală produce moartea animalelor în 24 de ore de la injecția intramusculară. Tegumentul şi muşchii adiacenți zonei injectate sunt complet lizate;
- β-*toxina* are efecte colagenazice. Este o metaloprotează care clivează colagenul nativ triplu-helix şi gelatina. Pe baza proprietăților fizice s-au identificat 7 variante de colagenaze;
- γ-*toxina*, o protează activată de gruparea tiol, ce digeră gelatina, cazeina, dar este inactivă față de colagen;
- δ-*toxina*, o enzimă proteolitică cu activitate elastazică, inactivată reversibil în prezența agenților reducători;
- ε-*toxina*, o hemolizină labilă la O_2, asemănătoare serologic cu cele produse de alte clostridii.

C. difficile este un component al *microbiotei normale a intestinului* la copii şi la un procent mic de adulți. Lichefiază gelatina, dar nu este proteolitic. Fermentează fructoza, glucoza, manitolul, manoza şi xiloza. Este negativ pentru lecitinază şi lipază şi produce un amestec de acizi (acetic, butiric, izobutiric, valeric, izovaleric, izocaproic, formic şi lactic în mediul cu extract de levuri şi glucoză).

Inițial s-a izolat dintr-o *colită pseudomembranoasă* (PMC) umană post-tratament cu antibiotice, ulterior maladia fiind reprodusă la hamster, cobai, iepure, după administrarea antibioticelor. Microbiota bacteriană normală este bariera majoră protectoare față de colonizarea cu agenți patogeni. Dacă microbiota este perturbată, gazda devine sensibilă la colonizare cu specii alohtone sau la multiplicarea masivă a unor specii indigene condiționat-patogene. Utilizarea antibioticelor creează condiții predispozante la PMC, deoarece inhibă dezvoltarea microbiotei normale, cu apariția unui dezechilibru numeric al speciilor componente, stare denumită *disbioză*. Orice antibiotic poate induce PMC, dar clindamicina are cel mai înalt potențial.

C. difficile este toxigen *in vitro* şi *in vivo* şi produce două toxine cu potențial letal: o *enterotoxină* (toxina A – de 400–600 kDa) şi o *citotoxină* (toxina B – de 360–500 kDa). Ambele determină efecte letale după injectare subcutanată sau intramusculară la şoarece, hamster şi maimuța rhesus, iar *in vitro* determină efecte citopatice asupra celulelor animale şi umane. Cele două toxine se găsesc în supernatantul culturilor de *C. difficile*.

Toxina A se leagă de gangliozidul GM_1 al bordurii în perie a enterocitului şi este la fel de activă ca şi toxina holerică. Toxina B are acţiune predominant citotoxică şi este mai puternică decât toxina A. Ambele toxine se găsesc în scaunul pacienţilor cu PMC.

Diagnosticul infecţiei cu *C. difficile* se pune după detectarea uneia sau ambelor toxine în scaun şi prin observarea endoscopică a pseudomembranelor sau a microabceselor mucoasei colonului la pacienţii cu diaree post tratament cu antibiotice, în special cu ampicilină şi clindamicină.

Diareea asociată cu antibioticele este moderată, mai uşoară decât PMC şi datorată disbiozei intestinale, în care predomină *C. difficile*.

Bibliografie selectivă

1. Brook I. 2008. Anaerobic Infections Diagnosis and Management. Ed. Informa Healtheare USA, pp. 1–17
2. Dixon T. C., Meseslson M., Guilemin J. et al. 1999. Anthrax. N Engl J Med 341: 815–826
3. http://microbiology2009.wikispaces.com/file/view/clostridium_tetani.gif http://www.eol.org/pages/Clostridium_septicum
4. http://sitemaker.umich.edu/mc5/files/clostridium_difficile.jpg
5. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0f/Clostridium_difficile_01.png
6. http://www.graphicshunt.com/health/images/clostridium_perfringens
7. http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english
8. http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english/showmorf
9. http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/english/showmorf.asp?articleid=2
10. http://www.millennium-ark.net/NEWS/08_Health/08_Health_pics/081201.clostridium.jpg)
11. http://www.millennium-ark.net/NEWS/08_Health/08_Health_pics/081201.clostridium.jpg
12. http://www.path.cam.ac.uk/partIB_pract/P27/P27_08-09v01asc.htm
13. http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/Clostridium+perfringens.
14. McBride B. W., Turnbull P. Cb. 1999. *Bacillus*, Infection and Immunity 1: 311 Ed. P. Delves, Ivan M. Roitt, Academic Press.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

9. BACILI GRAM POZITIVI NESPORULAŢI

În cadrul acestui grup sunt incluse speciile genului *Corynebacterium* şi cele anaerobe, aparţinând genului echivalent *Propionibacterium* (care va fi tratat la capitolul dedicat infecţiilor anaerobe), componente ale microbiotei umane normale cutanate şi asociate mucoaselor. *Corynebacterium diphtheriae*, agentul difteriei este cel mai important membru al grupului pentru patologia umană. *Listeria monocytogenes* şi *Erysipelothrix rhusiopathiae* sunt patogeni la specii animale, dar ocazional pot produce boli grave la om.

9.1. Genul Corynebacterium

În prezent, boala difterică este practic eradicată, cazuri sporadice apărând în colectivităţi de copii nevaccinaţi (în ţara noastră, 1–2 cazuri/an). Maladia difterică este gravă, cu mortalitate rapidă în 24–48 de ore sau supravieţuire cu sechele grave.

Denumirea de *Corynebacterium* a fost dată de Lehman şi Newman în 1896 unor bacili Gram pozitivi, drepţi sau curbaţi, frecvent cu aspect măciucat, colorați neomogen datorită incluziilor de polifosfat, grupaţi după unghiuri ascuţite sau palisade. Frecvent apar forme ovoide sau cocoide (fig. 232). Celulele sunt imobile, nesporulate şi necapsulate.

Fig. 236. C. diphteriae. Morfologia celulelor pe frotiul colorat Gram (x 1000, x 1200, x 1500) (http://www.sciencephotolibrary.com/images/showFullWatermarked.html/B220081-LM_of_Corynebacterium_diphtheria_bacteria-SPL.jpg, http://www.thefullwiki.org/Corynebacterium_diphtheriae, http://www.monografias.com/trabajos60/tracto-respiratorio-superior/tracto-respiratorio-superior2.shtml).

În structura peretelui celular se găseşte *acidul* mezodiaminopimelic, *polizaharidul* alcătuit din arabinoză, galactoză şi manoză şi *acidul micolic* cu catenă de 22-36 atomi de C. Polizaharidul şi acizii micolici îi conferă proprietatea de acido-alcoolo-rezistenţă.

Genul *Corynebacterium* se înrudeşte cu *Mycobacterium* şi cu *Nocardia*, datorită structurii peretelui, deosebirea făcându-se după tipul de peptidoglican şi după lungimea catenei de C din acizii micolici.

Speciile de *Corynebacterium* nu produc hemolizine, sunt catalazo-pozitive, iar unele specii patogene produc toxine.

Genul *Corynebacterium* cuprinde la ora actuală peste 80 de specii, care se deosebesc prin caracterele biochimice: hidroliza esculinei, lichefierea gelatinei etc.

După habitat şi patogenitate, speciile de *Corynebacterium* se clasifică în următoarele categorii:
- specii patogene pentru om şi animale;
- specii patogene pentru plante;
- specii nepatogene.

C. diphteriae este agentul cauzal al difteriei, *C. minutisimum* produce o dermatoză a pielii, *C. mycetoides* este agentul patogen al ulcerelor tropicale la om, iar *C. urealyticum* este agent al infecțiilor urinare.

C. ulcerans este patogen al bovinelor, dar poate produce la om faringită exudativă sau ulcere ale tegumentului mâinii; *C. ovis* poate să determine limfadenita granulomatoasă acută sau pneumopatii cu eozinofile la om.

Corinebacteriile nepatogene sunt asemănătoare cu cele patogene (difteromorfe), Gram pozitive sau Gram variabile, cu același mod de grupare și pot produce infecții oportuniste. *C. hofmani*, component al microbiotei normale a bucofaringelui, poate produce infecții ale tractului urinar la pacienții cu transplant renal sau endocardită post-chirurgie valvulară.

Corinebacteriile grupului J. K se dezvoltă pe tegument și în 25–30% dintre cazuri constituie agentul cauzal al infecțiilor intraspitalicești.

Conceptul bolii difterice datează din antichitate (boala gâtului transmisibilă la copii), iar cel modern a fost formulat de Bretoneau (1821), care a dat denumirea de *difterită* și ulterior de *difterie*.

Klebs a descoperit agentul patogen în pseudomembrane, iar Loeffler l-a cultivat pe serul de bou coagulat. Roux a confirmat că filtratul de cultură determină leziuni asemănătoare cu cele produse de infecție.

Difteria este o *toxemie*. Behring și Kitasato au modificat toxina și au obținut serul imun antitoxină prin imunizarea calului. Ramon (1929) a inactivat toxina sub acțiunea formolului și a căldurii și a obținut anatoxina diftерică, utilizată ca vaccin. În 1931, *C. diphteriae* s-a clasificat în tipuri: *gravis, mitis* și *intermedius*. În 1951, Freeman a descoperit fenomenul *conversiei* tulpinilor netoxigene în variante toxigene, prin lizogenizare. Straus și Hende (1959) consideră că toxina diftерică acționează prin blocarea sintezei proteinelor în celulele sensibile, iar Pappenheimer (1970) a descoperit structura toxinei difterice.

C. diphteriae este localizat în tractul respirator, răni sau pe tegumentul persoanelor infectate și al purtătorilor normali. Este diseminat prin contact direct la persoanele sensibile. Bacilii rămân la poarta de intrare, fie în pseudomembranele faringiene (fig. 234), fie în secreția oculară (în cazul infecției oculare), în secreția vulvară (difteria vaginală) sau în ulcerele profunde ale pielii în difteria cutanată specifică pentru zonele calde.

C. diphteriae se găsește la câine, pisică, purtătorii naturali, fără să determine îmbolnăviri.

Tulpinile lizogenizate cu un fag sunt toxigene. Genomul fagului temperat determină două fenomene importante: *lizogenia* și *toxigeneza*. Unii fagi sunt tox^+, iar alții sunt tox^-. Dacă genomul fagic poartă gena *tox*, celulele de *C. diphteriae* sintetizează toxina.

Bacilul difteric rezistă 10 minute la 60°C, dar este mult mai rezistent la uscăciune și întuneric; rezistă 15 zile în lapte și luni de zile pe obiectele infectate cu păstrarea patogenității. Este foarte sensibil la antibioticele uzuale: eritromicină, penicilină, mai puțin sensibil la oxacilină și rareori apar tulpini rezistente la tetraciclină, dar este distrus de antisepticele uzuale.

C. diphteriae este o bacterie aerobă facultativ anaerobă, care se dezvoltă pe medii simple, cu adaos de ser de bou și eventual, de ou. Temperatura de dezvoltare este de 15–40°C, cu optimum la 37°C. Sinteza maximă de toxină este la 35°C.

Toate speciile fermentează glucoza, dar nu fermentează zaharoza. *C. diphteriae*, *C. ulcerans* și *C. ovis* produc *cistinaza*, enzima care hidrolizează cistina cu eliberarea H_2S (fig. 235). Corinebacteriile difteromorfe nu produc cistinază.

Fig. 234. Pseudomembrane în infecția diftерică (http://www.monografias.com/trabajos60/tracto-respiratorio-superior/tracto-respiratorio-superior2.shtml).

Fig. 235. Aspectul caracteristic al coloniilor negre formate de *C. diphteriae* pe mediu cu cistină și telurit (Tinsdale modificat) (http://www.monografias.com/trabajos60/tracto-respiratorio-superior/Image26014.gif)

C. diphteriae nu produce urează, ceea ce diferențiază această specie de *C. ulcerans* şi *C. ovis*, specii pozitive pentru testul ureazei. La difteromorfi, testul ureazei este variabil.

Toxina diftерică

Difteria este produsă de tulpinile de *C. diphteriae* lizogenizate cu un fag *tox*$^+$ şi se manifestă local la nivel faringo-amigdalian, cu alterarea necrotică a mucoasei. Procesul infecțios este asociat cu exsudat inflamator şi formarea pseudomembranelor alb-cenuşii, aderente de mucoase şi cu procese hemoragice. Membranele pot invada faringele şi produc senzația de sufocare. Ganglionii regionali cresc în volum, apare starea febrilă şi senzația de rău general. În formele hipertoxice pot apărea manifestări hemoragice plurifocale şi fenomenul de miocardită, datorită tropismului toxinei pentru miocard, sau paralizii de văl palatin şi de diafragmă, datorită tropismului toxinei pentru țesutul nervos.

Difteria este o infecție localizată a tractului respirator superior produsă de *C. diphteriae*, a cărui virulență este determinată în exclusivitate de secreția *toxinei difterice*. Exotoxina este eliberată în focarul primar al infecției, ajunge în mediul intern şi produce efecte sistemice: degenerarea parenchimatoasă şi depozitarea lipidelor în ficat, necroza muşchiului cardiac, a ficatului, rinichiului, corticosuprarenalelor, uneori cu hemoragii ample. În stadiile primare, toxina favorizează invazivitatea prin distrugerea celulelor epiteliale şi a celulelor inflamatorii fagocitare.

Toxina diftерică este sintetizată numai de bacteriile *lizogenizate* de un virus specific. Toxina este codificată de o genă structurală fagică (*tox*). Gena *tox* poate să se exprime în timpul multiplicării fagului şi chiar când fagul se găseşte în celulă sub forma fagului vegetativ, ca genom liber, nereplicativ şi neintegrat.

Microbiota indigenă din faringe, la om, conține corinebacterii difteromorfe care nu sintetizează toxina, dar care pot deveni toxice după ce sunt lizogenizate de fag.

Difteria este o maladie care presupune, pe de o parte, interacțiuni complexe între organismul uman şi cel infecțios, iar pe de altă parte, între celula bacteriană şi fagul lizogenizant. Sinteza toxinei nu este relevantă pentru supraviețuirea celulei şi nici pentru desfăşurarea ciclului de multiplicare virală.

Toxina diftерică este sintetizată sub forma unui polipeptid de 62 kDa. Molecula intactă are 2 punți S-S. Una dintre ele conectează o buclă sensibilă la tripsină. Sub acțiunea tripsinei rezultă *fragmentul A* (24 kDa) şi *fragmentul B* (36 kDa), separabile prin cromatografie.

Mecanismul de acțiune. După ce traversează membrana, toxina acționează enzimatic asupra EF-2 (factorul 2 de elongație a catenei polipeptidice), una dintre enzimele citosolice (solubile) necesare sintezei peptidelor. Celulele procariote nu au această enzimă şi sunt rezistente la acțiunea toxinei.

Toxina posedă o activitate enzimatică unică şi catalizează următoarele reacții:

$$\text{EF-2} + \text{NAD} \text{ ----- } \underset{\substack{\text{EF-2 legat covalent cu}\\ \text{adenozin-difosfat-riboza}\\ \text{din NAD. EF-2 legat}\\ \text{este inactiv.}}}{\text{ADPR-EF-2} + \text{nicotinamida} + H^+}$$

Se consideră că stoparea bruscă a sintezei proteinelor determină efectele necrozante şi neurotoxice ale toxinei difterice. O exotoxină cu acelaşi mecanism de acțiune poate fi produsă de *Ps. aeruginosa*.

Difteria la adulți se poate manifesta sub forme clinice inaparente, asemănătoare cu o faringită virală banală.

Epidemiologie. Difteria este o maladie infecțioasă a zonelor calde şi temperate. În țările cu climat rece, maladia este rară. Infecția diftерică apare în special la copii, dar are o frecvență semnificativă şi la adulți. Infecția este specifică pentru colectivități şi este condiționată de nivelul de imunitate şi de circulația agentului patogen.

Infecția diftерică nu reprezintă o problemă de sănătate publică, deoarece este controlată prin vaccin: trivaccinul DTP (diftero-tetano-pertusis), până la vârsta de 3 ani; bivaccinul diftero-tetanic, la 6 şi 14 ani; monovaccinul ADPA, pentru populația de peste 16 ani.

BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

După 6–7 ani de la revaccinare, nivelul imunității scade și apar grupele de risc (populația de 30–40 de ani), deoarece agentul patogen nu circulă. De aceea, au apărut mici focare de difterie în populația adultă. Infecția cu *C. diphteriae* nu se poate eradica, dar procesul patologic se poate elimina.

Diagnosticul necesită următoarele teste:

- testul de toxigenitate, practicat numai în laboratoarele specializate, se bazează pe metoda difuziei anticorpilor specifici dintr-un disc de hârtie de filtru care se depune pe suprafața plăcilor cu mediu agarizat, însămânțat cu tulpinile testate. După 48 de ore de incubare, anticorpii precipită toxina produsă de tulpinile toxigene (fig. 236);

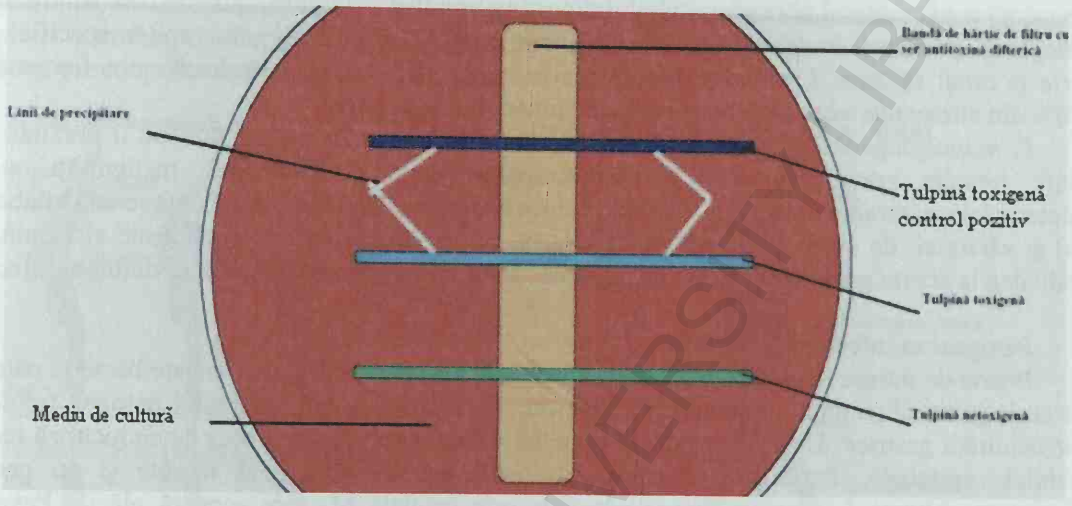


Fig. 236. Reprezentarea schematică a reacției de imunoprecipitare care pune în evidență tulpinile toxigene.

- metoda PCR, pentru detectarea genei tox;
- metoda ELISA, pentru detectarea toxinei difterice produsă de izolatele clinice de *C. diphteriae*.

Pentru controlul infecției se administrează *anatoxina difterică* adsorbită pe sărurile de aluminiu (hidroxid sau fosfat). Vaccinul se administrează sub forma trivaccinului DTP (diftero-tetano-pertusis).

9.2. Genul Listeria

Genul *Listeria,* ce conține șase specii (dintre care *L. monocytogenes* și *L. ivanovii* sunt implicate în patologia umană și respectiv animală) este inclus la ora actuală în familia *Listeriaceae,* ord. *Bacillales*, care mai cuprinde și genul *Brochothrix. L. monocytogenes* este un bacil scurt (asemănător ca morfologie cu *Corynebacterium*), uneori grupat în lanțuri scurte, Gram pozitiv, cu forme cocobacilare (ce pot fi confundate cu streptococii) (Todar, 2008), facultativ anaerob, nesporulat, necapsulat, pozitiv pentru catalază, ce crește ușor pe geloză nutritivă, iar pe agar-sânge produce hemoliză completă de tip β (fig. 237, 238).

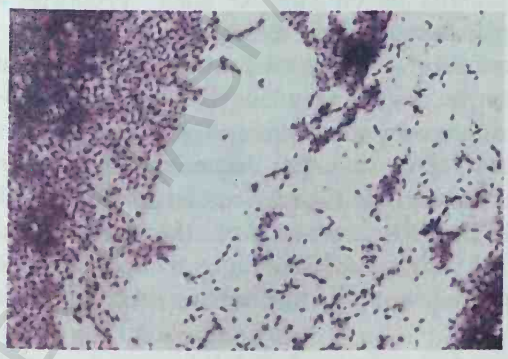


Fig. 237. Morfologia *L. monocytogenes* pe frotiu colorat Gram (Todar, 2008).

Fig. 238. Aspectul culturii de *Listeria* pe geloză sânge (www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/images/kolonier/listba.jpg).

Creşte cu o rată optimă la 30–37°C pe mediu Müller-Hinton, este mobilă la temperatura camerei (20–25°C), dar imobilă la 37°C. Creşte la temperaturi de 4–10°C, ceea ce permite îmbogăţirea la rece şi izolarea de alte bacterii contaminante prin incubarea de durată la temperatura de +4°. Creşte bine la pH neutru sau uşor alcalin şi este distrusă la pH mai mic de 5,5. Testul motilităţii rapide şi al hemolizinei diferenţiază *L. monocytogenes* de alte specii de *Listeria.* Fermentează glucidele cu acidifierea mediului, fără gaz.

L. monocytogenes este un agent important al zoonozelor animalelor domestice. Este larg răspândită în natură, fiind prezentă în sol, pe materia vegetală în descompunere şi este de asemenea componentă a microbiotei normale a tubului digestiv al multor mamifere. Între 5–10% dintre adulţii umani pot fi purtători de *Listeria* în intestin, ceea ce explică prezenţa anticorpilor specifici anti-*Listeria* la omul sănătos. *L. monocytogenes* contaminează alimentele: se izolează cu o frecvenţă de 15–70% din alimentele vegetale proaspete, lapte proaspăt, peşte, carne.

L. monocytogenes este un patogen oportunist. Cel mai mare risc de infecţie îl prezintă nou-născuţii, femeile gravide, persoanele imunocompromise şi debilitate (cu malignităţi, supuse chimioterapiei sau terapiei imunosupresoare, cu ciroză sau alcoolism, cu insuficienţă renală, diabet sau lupus) şi vârstnicii de peste 60 de ani, la care poate cauza infecţii severe (septicemie şi meningită). Mortalitatea la aceste grupe de risc este de 30–40%. Adulţii imunocompetenţi supravieţuiesc infecţiei.

Patogeneza infecţiei cu ***Listeria***

Poarta de intrare în infecţia cu *L. monocytogenes* este tractul digestiv, în care bacteria pătrunde odată cu ingestia alimentelor contaminate (derivate din lapte, vegetale). Agentul patogen trebuie să reziste acidităţii gastrice. Ulterior invadează epiteliul intestinal printr-un proces de endocitoză realizat de celulele epiteliale. Traversarea barierei intestinale are loc în câteva minute şi nu necesită multiplicarea. Alteori *L. monocytogenes* pătrunde prin celulele M, care acoperă plăcile Peyer, ce reprezintă situsul preferenţial al multiplicării. *Hemolizina*, ca principal factor de virulenţă, este obligatorie pentru acest proces. După ce ajunge în sânge, diseminarea hematogenă se face în orice ţesut din organism, dar *L. monocytogenes* manifestă un *tropism marcat pentru SNC* şi *placentă.*

Infecţia poate fi limitată la nivelul mucoasei intestinale (enterită), diseminarea bazolaterală a agentului patogen realizându-se direct de la o celulă la alta, printr-un mecanism celular care implică polimerizarea actinei celulare. Perioada de incubaţie pentru infecţia invazivă variază de la 11 la 70 de zile, cu o medie de 31 de zile.

Invazia bacteriană a substratului celular este un proces în mai multe trepte:

- *aderenţa*, care poate fi o interacţie specifică cu molecule receptor sau un proces care anulează forţele de respingere sau efectele hidrofobe ale diferitelor suprafeţe;
- *intrarea* în celula epitelială prin inducerea fagocitozei;
- *multiplicarea* şi *deplasarea* în citoplasma celulei epiteliale;
- *trecerea în celula epitelială adiacentă* pe calea protruziilor digitiforme ale suprafeţei celulei;
- *moartea* celulei gazdă.

Inocularea intravenoasă a evidenţiat că *L. monocytogenes* este rapid eliminată de macrofagele rezidente din splină şi din ficat. Celulele Kupffer ce tapetează sinusoidele iniţiază răspunsul imun anti-*Listeria*, prin stimularea multiplicării limfocitelor T şi secreţia de citokine. O mică proporţie a celulelor bacteriene supravieţuiesc şi cresc numeric în 2–5 zile prin diviziune în hepatocite.

Fagocitele înglobează *L. monocytogenes* prin intermediul receptorilor pentru C3bi şi pentru C1q. Internalizarea este eficientă în absenţa serului, ceea ce indică faptul că interacţiunile non-opsonice receptor-ligand au rol în legarea *L. monocytogenes* la nivelul membranei.

Infecţia sistemică cu *L. monocytogenes* sugerează faptul că celula bacteriană recunoaşte un număr de receptori diferiţi ai celulei eucariote, ce includ *E-caderina* (o glicoproteină transmembranară), *receptorul pentru C1q*, componentele *matricei extracelulare* (heparan-sulfatul (un proteoglican) şi fibronectina). E-caderina este o moleculă de aderenţă intercelulară, dependentă de Ca^{2+}, localizată pe suprafaţa bazolaterală a celulelor epiteliale şi care mediază infecţia celulelor epiteliale polarizate.

Liganzii bacterieni identificaţi sunt proteine de suprafaţă – *internalina Inl A*, *proteina Act A* (inductoare a polimerizării actinei) şi *p60.*

p60 este o *proteină de aderență* a suprafeței bacteriene – o *adezină*, cu rol dublu: leagă celula bacteriană de celula gazdă și declanșează endocitoza. Toate tulpinile invazive secretă *p60* în cantități mari. Proteina se găsește în supernatant, dar probabil o cantitate mică rămâne atașată pe suprafața celulei bacteriene. Probabil, pentru invazie este esențială *p60* legată la suprafața celulei, deși nu poate fi exclus rolul moleculelor libere. *p60* este o proteină bazică și probabil recunoaște un receptor specific acid, sau neutralizează sarcinile negative ale suprafeței celulei gazdă, favorizând un contact mai strâns între cele două celule.

Internalina (*Inl*) *A* este o proteină a suprafeței bacteriene, codificată de gena de virulență (*inl A*), care mediază interacțiunea bacteriei cu receptorii celulei eucariote. Internalina interacționează cu receptorii membranei citoplasmatice (E-cadherina) și induce reorganizarea actinei care determină formarea pseudopodelor și fagocitoza (fig. 239).

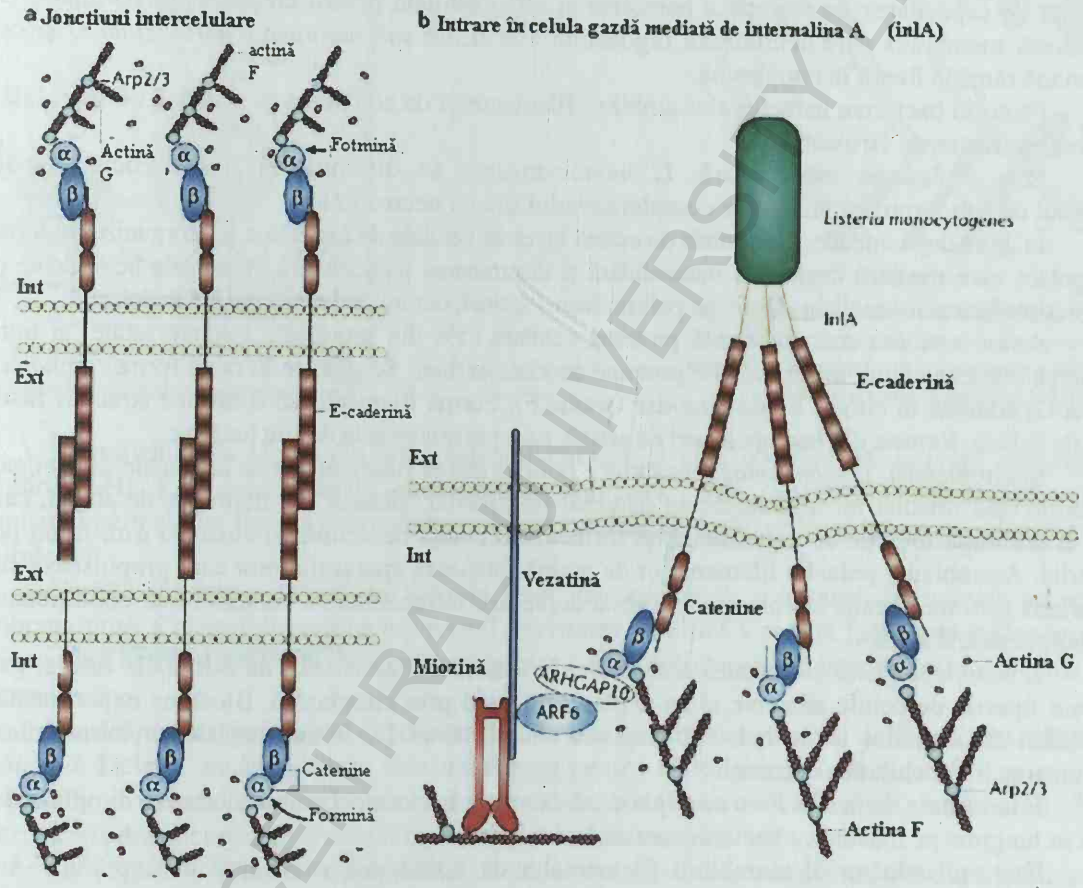


Fig. 239. Reprezentarea schematică a mecanismului invaziei celulelor gazdă de către *Listeria* prin intermediul internalinei A (Hamon și colab., 2006).

Mutațiile în gena *inl A* anulează invazivitatea tulpinii de *L. monocytogenes*. Au fost descrise molecule omologe ale *Inl A* (*Inl B*), care mediază invazia în diferite tipuri tisulare (*Inl B* – pentru hepatocite).

Proprietățile de aderență ale invazinelor sunt diferite de acelea ale adezinelor bacteriilor extracelulare, care de asemenea leagă bacteria de receptorii celulei gazdă, dar nu declanșează endocitoza.

Interacțiunile *L. monocytogenes* – celulă gazdă pot fi mediate de *lectine*.

Multe bacterii patogene invadează țesuturile gazdei prin inducerea funcției endocitare a celulei gazdă. Fenomenul se numește *endocitoză indusă de parazit* și este operativ pentru atașarea și intrarea *L. monocytogenes* în celulele epiteliale ale mucoasei intestinale, dar și *in vitro*, în celulele liniilor maligne. Endocitoza este inhibată de citocalazina D, un agent chimic care inhibă asamblarea microfilamentelor de actină.

Invazia semnifică pătrunderea celulei bacteriene în interiorul celulei gazdă. Fagocitoza se produce printr-un mecanism activ *dependent de actină*, dar independent de clatrină. Celula bacteriană

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

este endocitată într-o veziculă derivată din membrana citoplasmatică. Invazia substratului celular nu este dependentă de *listeriolizina O*.

Virulența L. monocytogenes este conferită de capacitatea de a creşte în celulă, de prezența Fe într-o formă disponibilă, de catalază, de producerea SOD şi de o proteină de suprafață cu funcție hemolitică – *listeriolizina O*. SOD oferă protecție față de radicalul superoxid. Tulpinile cu cea mai înaltă activitate catalazică au cea mai înaltă activitate SOD.

Virulența poate fi influențată de temperatura de creştere: la temperatură scăzută (4°C), virulența creşte.

In vitro, compuşii Fe stimulează creşterea *L. monocytogenes* şi sugerează posibila implicare a metabolismului Fe gazdei în procesul infecțios.

L. monocytogenes supraviețuieşte şi creşte în interiorul celulei gazdă. Virulența bacteriană conferită de capacitatea de secreție a hemolizinei este esențială pentru creşterea intracelulară. După fagocitoză, membrana care delimitează fagosomul este *lizată sub acțiunea listeriolizinei O* şi celula bacteriană rămâne liberă în citoplasmă.

Factorul bacterian inductor al asamblării filamentelor de actină este o proteină de suprafață *Act A*, cu rol de factor de virulență.

Prin deplasarea intercelulară, *L. monocytogenes* se diseminează foarte eficient, evitând contactul cu anticorpii, cu proteinele complementului sau cu neutrofilele.

În 2 ore după infecție, filamentele de *actină* învelesc celulele de *Listeria* şi se reorganizează formând cozi polare, care mediază deplasarea intracelulară şi diseminarea intercelulară. Mutantele nevirulente (cele care nu sintetizează listeriolizina O) induc polimerizarea actinei, dar nu se deplasează intracelular.

Actina este cea mai abundentă proteină celulară (5% din proteinele celulare totale) şi intră în alcătuirea citoscheletului, alături de alte proteine asociate actinei. Se găseşte în două forme: *monomerică* (actina G) solubilă în citosol şi *filamentoasă* (actina F). Forma filamentoasă constituie structuri flexibile aranjate helical, formate din homopolimeri de actină, care pot atinge sute de μm lungime.

În citoplasmă, *L. monocytogenes* induce polimerizarea filamentelor de actină ale celulei gazdă. Bacteriile sunt imediat înconjurate de un material fin, fibrilar, alcătuit din filamente de actină, care la circa 2 ore după infecție se organizează şi formează o coadă de actină de circa 40 μm, la un pol al bacteriei. Asamblarea polară a filamentelor de actină formează aparatul motor care propulsează celula bacteriană spre membrana citoplasmatică. Rata deplasării intracelulare a bacteriei este condiționată de rata polimerizării actinei.

L. monocytogenes stimulează asamblarea orientată a filamentelor de actină ale celulei gazdă, în toate tipurile de celule aderente şi se deplasează rapid prin citoplasmă. Blocarea experimentală a asamblării filamentelor de actină, sub acțiunea citocalazinei D, inhibă deplasarea intracelulară şi diseminarea intercelulară a bacteriei.

Filamentele de actină *F* nu se deplasează odată cu bacteria, ci sunt ancorate în citoplasmă. Ele cresc în lungime pe măsură ce bacteria continuă să migreze.

Factorul inductor al asamblării filamentelor de actină este o proteină de suprafață *-Act A*, sintetizată de celula bacteriană. Tulpinile de *L. monocytogenes* mutante pentru gena *act A* nu asamblează actina, nu se deplasează în celulă şi nu se diseminează în monostratul celular.

Unele celule de *L. monocytogenes* ajung la periferia celulei, vin în contact cu membrana, unde determină formarea unor prelungiri digitiforme (filopodii, protruzii), la a căror extremitate se găseşte câte o celulă bacteriană. Protruziile pot fi ingerate de celulele adiacente (macrofage, enterocite, hepatocite) printr-un proces de endocitoză (fig. 240).

Factorii de virulență

Listeriolizina O este un factor major al virulenței şi secreția sa este esențială pentru creşterea intracelulară a bacteriei. Este o hemolizină (Hly) care lizează vezicula membranară de endocitoză şi permite trecerea bacteriei în citoplasmă, unde creşte, se multiplică şi se diseminează intercelular (fig. 241).

Tulpinile Hly^- invadează substratul celular ca şi tulpinile Hly^+, dar capacitatea de supraviețuire ulterioară în celulă este diminuată semnificativ.

Tulpinile Hly^- induc polimerizarea actinei, dar nu se deplasează în citoplasmă. Învelişul de actină nu se reorganizează şi celulele bacteriene nu se diseminează în celulele învecinate.

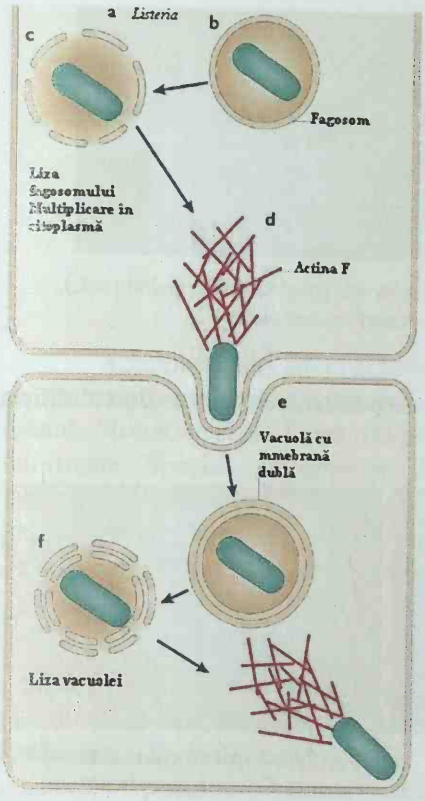


Fig. 240. Reprezentarea schematică a ciclului intracelular în infecția cu *Listeria* (Hamon și colab., 2006).

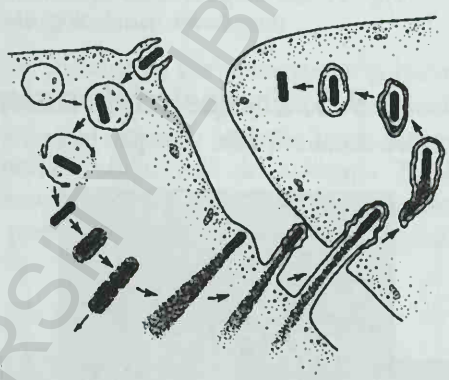


Fig. 241. Reprezentarea schematică a modului în care LLO permite eliberarea bacteriei din vacuolele de endocitoză și propagarea infecției la celulele învecinate (Goldberg, 2001).

Hemolizina s-a izolat din supernatantul culturii și este o citolizină activată de gruparea sulfhidril (SH). Este asemănătoare altor proteine din acest grup (SLO). Nu este toxică pentru organismul animal, dar lizează eritrocitele, eliberând cantitatea de Fe necesar bacteriei, mărind gradul de virulență.

Hemolizina este o toxină din familia celor *dependente de colesterol*, formatoare de pori în membrana țintă. Colesterolul inhibă ireversibil activitatea citolitică a acestei familii de toxine-enzime. Toxinele sunt active numai față de membranele care conțin colesterol. Colesterolul este molecula țintă a acestei toxine.

Două tipuri de *fosfolipază C* pot contribui la liza membranei vacuolei de fagocitoză, alături de *hemolizină*. Deleția oricăreia dintre cele două gene pentru fosfolipaze (*plc A* și *plc B*) nu modifică semnificativ virulența. Toate vacuolele ce conțin celule de *Listeria* sunt acidifiate, dar numai 14% din bacterii scapă din vacuole. Cele care rămân în vacuole sunt omorâte.

Act A este o proteină a suprafeței *L. monocytogenes* care este produsă după pătrunderea bacteriei în celula gazdă și este ancorată în membrana celulei bacteriene printr-o secvență de 26 aminoacizi de la capătul COOH, în timp ce prin capătul NH_2 interacționează cu monomerii de actină, prin intermediul proteinelor VASP- (*vasodilator-simulated phosphoprotein*), care leagă actina G și F (fig. 242).

Infecția clinică. Infecția intrauterină produce granulomatoza infantiseptică, o formă cu leziuni granulomatoase diseminate în ale cărei celule se găsește *L. monocytogenes*. La adulții imunosupresați poate apărea o meningoencefalită bacteriană, cu manifestări clinice variate, de la forma insidioasă la cea fulminantă.

Animalele domestice și sălbatice se infectează odată cu ingestia masei vegetale contaminate. La rumegătoare poate să producă meningoencefalită, cu sau fără bacteriemie.

Diagnosticul infecției cu *L. monocytogenes* presupune izolarea agentului infecțios din sânge sau din lichidul cefalorahidian.

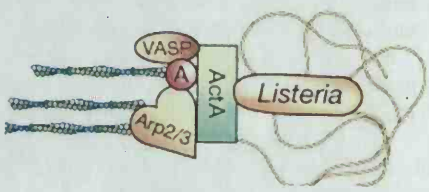


Fig. 242. Reprezentarea modului în care ActA interacționează cu VASP (*vasodilator-simulated phosphoprotein*), a cărei structură o mimează, și cu monomerii de actină Arp 2/3 (Gruenheid și Finlay, 2003).

BCU IASI CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

Fig. 243. Morfologia celulelor de *Erysipelothrix* pe frotiu colorat Gram (http://www.google.ro/iErysipelothrix&), (http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english/showmorf.asp?articleid=62).

9.3. *Erysipelothrix rusiopathiae* este un bacil Gram pozitiv, care pe mediu solidificat formează colonii mici transparente, strălucitoare (fig. 244).

Fig. 244. Aspectul culturii de *Erysipelothrix* pe geloză sânge (http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english/showmorf.asp?articleid=62).

Fig. 245. Aspectul clinic al erisipelului la porc.

Fig. 246. Aspectul clinic al infectiei cu *Erysipelothrix* la om.

Se decolorează uşor şi uneori apare ca fiind Gram negativ. Pe mediul TSI produce H_2S, caracter prin care se deosebeşte de *L. monocytogenes*. Testele catalazei, oxidazei şi al producerii indolului sunt negative. Este β-hemolitic. Infectează porcul (la care produce erizipelul) oaia, curca, rața (fig. 245). Omul se contaminează cu *E. rusiopathiae* prin contact direct cu animalele sau cu produsele acestora, iar infecția produce leziuni de culoare violacee la degete, caracterizate prin edem şi durere (fig. 246). Lipseşte puroiul, ceea ce o deosebeşte de infecția tegumentară cu *Staphylococcus sp.* Infecția cu *E. rusiopathiae* se vindecă în 3–4 săptămâni cu penicilina G.

Bibliografie selectivă

1. Gruenheid S., Finlay B. B. 2003. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. Nature 422: 775–781
2. Hamon M., Bierne H., Cossart P. 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. Nature Reviews Microbiology 4:423–434
3. http://mcb.berkeley.edu/labs/portnoy/Listeria
4. http://www.google.ro/iErysipelothrix
5. http://www.microbiologyatlas.kvl.dk/bakteriologi/english/showmorf.asp?articleid=62
6. http://www.monografias.com/trabajos60/tracto-respiratorio-superior/tracto-respiratorio-superior2.shtml
7. http://www.sciencephotolibrary.com/images/showFullWatermarked.html/B220081-LM_of_Corynebacterium_diphtheria_bacteria-SPL.jpg
8. http://www.thefullwiki.org/Corynebacterium_diphtheriae
9. Marcia B. Goldberg – Actin Based Motility of Intracellular Microbial Pathogens – Micr. and Mol. Biol. Rev, 2001, vol. 65, no.4, pp. 595–626.
10. Murray, et al.: Medical Microbiology, 3rd ed., 2010, Ghaffar A. Chapter 17. Zoonoses. Listeria, Francisella, Brucella, Bacillus and Yersinia.
11. Todar K. 2008. Todar's Online Textbook of Bacteriology. www.textbookofbacteriology.net
12. www.microbiologyatlas.kvl.dk/biologi/images/kolonier/listba.jpg

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

10. ACTINOBACTERII

Actinomicetele sunt bacterii filamentoase Gram pozitive, înrudite cu corinebacteriile şi includ reprezentanţi cu implicaţii clinice majore (*Mycobacterium* sp.), precum şi organisme saprobionte (genul *Streptomyces*). După diviziune, bacilii rămân asociaţi şi formează lanţuri lungi, uneori ramificate. Speciile patogene se diferenţiază pe baza comportamentului faţă de coloraţia Ziehl-Neelsen: cele acido-alcoolo-rezistente aparţin genului *Mycobacterium*; cele care dau o reacţie uşor pozitivă sunt incluse în genul *Nocardia*, iar cele negative pentru acido-alcoolo-rezistenţă aparţin genului *Streptomyces* şi *Actinomadura*.

10.1. *Nocardia asteroides* este un complex de specii patogene şi nepatogene, care se găsesc în sol şi în apă, diferenţiate pe baza sensibilităţii la antibiotice. Speciile de *Nocardia* sunt aerobe, Gram pozitive, pozitive pentru testul catalazei şi acidorezistente, produc urează şi hidrolizează parafina. În substrat, filamentele se ramifică, iar cele aeriene se fragmentează şi formează cocobacili. În peretele celular se găsesc acizi micolici cu catenă mai scurtă decât la *Mycobacterium*. Sunt considerate ca acidorezistente, dar se decolorează cu acid sulfuric 1–4%.

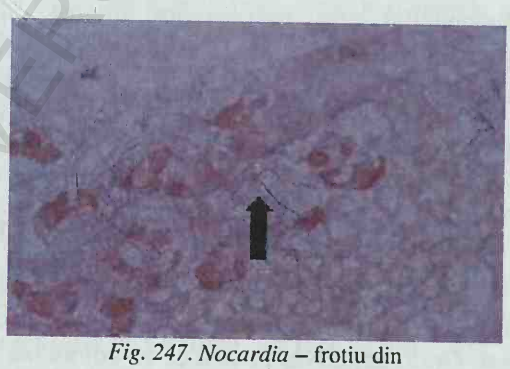


Fig. 247. Nocardia – frotiu din produsul patologic colorat Gram (http://www.med.cmu.ac.th/dept/pediatrics/06-interest-cases/ic-8-nocardia/case3.htm).

Nocardia este un agent patogen oportunist pentru indivizii cu disfuncţii ale imunităţii mediate celular, pentru imunosupresaţi, pentru pacienţii SIDA, alcoolici sau pentru cei trataţi cu corticosteroizi. *N. asteroides* produce o infecţie pulmonară cronică, cu posibilă diseminare la creier şi tegument. Infecţia cu *Nocardia* începe ca o pneumonie lobară cronică, manifestările fiind aceleaşi ca şi în cazul tuberculozei. Formarea granulomului şi cazeificarea sunt evenimente rare, aspectul patologic comun fiind formarea abcesului.

Pentru diagnostic se fac frotiuri din spută, puroi, LCR sau chiar din materialul biopsiei. Pe frotiul colorat Gram se observă cocobacili, bacili şi filamente lungi, uneori ramificate (fig. 247, 248).

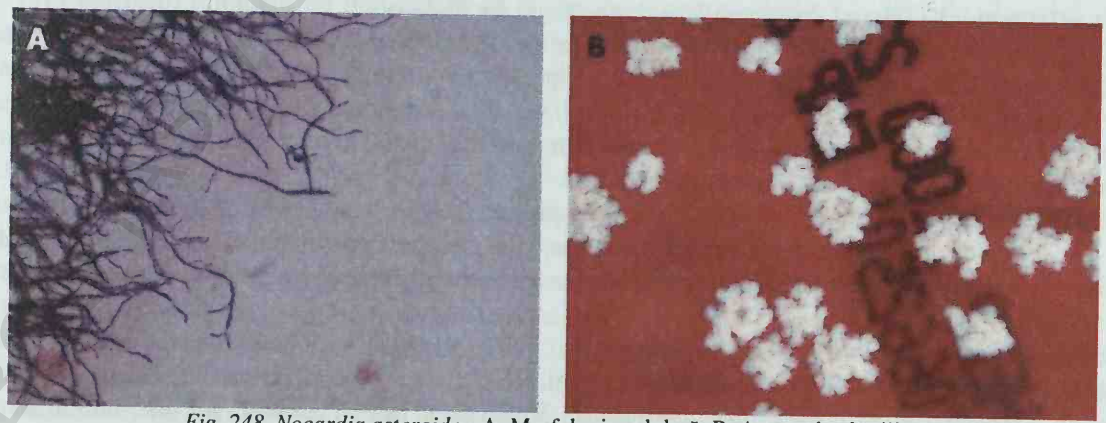


Fig. 248. Nocardia asteroides. A. Morfologia.celulară. B. Aspectul coloniilor pe geloză sânge (World J Gastroenterol. 2008 August 28; 14(32): 4977-4983).

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

Micetomul este o infecție cu progresie lentă, distructivă, nedureroasă, care se inițiază în țesutul conjunctiv al dermului și se disemenează prin continuitate în țesuturile adiacente (fig. 249, 250).

Fig. 249. Infecție cutanată cu *Nocardia* (http://www.asm.org/division/c/photo/nocard1.JPG).

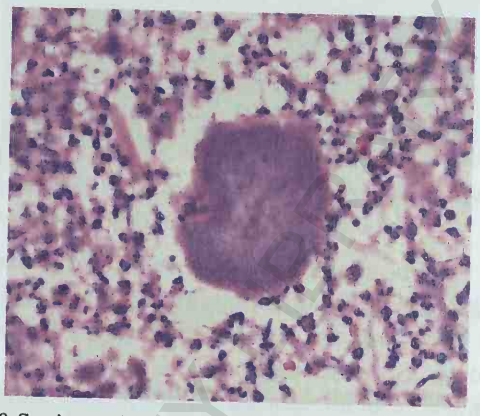


Fig. 250. Secțiune printr-un actinomicetom. Preparat histopatologic (http://www.flickr.com/photos/euthman/2111203428/).

Adeseori, leziunea este datorată contaminării cu fungi din sol, care colonizează țesutul subepitelial prin traumatisme minore. *Actinomicetomul* este un micetom produs de bacterii filamentoase ramificate: *Nocardia asteroides, N. brasiliensis, Actinomadura.* Leziunea este granulomatoasă, alcătuită din componente tisulare, bacili și filamente ramificate.

Agentul infecțios este sensibil la streptomicină, trimetoprim, sulfametoxazol, dapsone, dacă terapia începe timpuriu.

10.2. Genul *Mycobacterium*

Genul *Mycobacterium* a fost descris în 1881 de către R. Koch. Celulele sunt bacili nesporulați, imobili. Pe medii artificiale apar forme cocoide sau filamentoase. Nu sunt clasificate Gram pozitive sau Gram negative, pentru că se colorează greu datorită caracterului hidrofob al suprafeței, dar după colorare în condiții energice cu fuxină concentrată la cald, rezistă acțiunii decolorante cu acid și alcool, proprietate denumită *acido-alcoolo-rezistență.* Acido-alcoolo-rezistența se datorează compoziției chimice particulare a peretelui celular: acizi micolici cu catenă lungă de 78–90 atomi de C legați covalent de arabinoza și galactoza care formează polizaharidul parietal.

Reprezentanții genului *Mycobacterium* sunt obligat aerobi și *in vitro* se dezvoltă numai în condiții de aerare, iar *in vivo* infectează țesuturile cu o presiune parțială crescută a O_2. Micobacteriile au o compoziție chimică distinctă de a celorlalte bacterii: conțin o cantitate mare de lipide, glicolipide și ceruri, care le conferă caracterul hidrofob al suprafeței celulare, precum și acidorezistență sau rezistență la dezinfectanții simpli. Glicolipidele sunt importante pentru supraviețuirea speciilor parazite în monocit. Timpul de generație este mai mare de 20 de ore.

Speciile de interes clinic: *M. tuberculosis, M. leprae* și *M. avium intracellulare* (*M. avium* complex = MAC).

M. tuberculosis (bacili subțiri, drepți, de 0,4/3 μm) și într-o măsură mai mică *M. bovis*, sunt agenții tuberculozei, un proces patologic de mare importanță medicală. Infecția are un timp îndelungat de incubație, este latentă și are o evoluție lentă.

M. tuberculosis crește pe următoarele categorii de medii:

- *medii de* izolare: pot fi neselective sau selective prin adăugarea de antibiotice inhibitorii pentru microorganismele contaminante (cele mai folosite sunt mediile cu ou, Lowenstein și Jensen);
- *medii de întreținere,* cu glicerină: bulionul glicerinat, cartoful glicerinat, geloza glicerinată. Tulpinile izolate de la om cresc foarte bine în prezența glicerinei, iar cele izolate de la bovine (*M. tuberculosis bovis*) sunt inițial inhibate și cresc numai după o perioadă de adaptare;

– *mediile sintetice* (conţin săruri, vitamine, cofactori, acid oleic, glicerol) creează condiţii particulare de creştere, ceea ce duce la apariţia modificărilor morfologice, antigenice şi de virulenţă. Nu au niciun factor de creştere: Sauton, Dubos, Long. Dubos a adăugat la mediul sintetic, substanţe care accelerează creşterea *M. tuberculosis*, favorizând creşterea dispersată şi omogenă. O astfel de substanţă este Tween 80 (un ester al acidului oleic), un detergent solubil în apă, care hidratează suprafaţa celulei bacteriene. Pe mediu sintetic cu bilă de bou, s-a obţinut mutanta nevirulentă BCG (bacilul Calmette-Guerin), care îşi păstrează avirulenţa din 1923.

Pe mediile solide, coloniile de *M. tuberculosis* apar după 10—14 zile de incubare, iar ale variantei bovine, după 30–70 de zile. Coloniile sunt aderente la mediu şi emulsionează greu. Pe mediile lichide, cultura formează o membrană care se încreţeşte şi se brunifică. La început mediul se alcalinizează, apoi se acidifică şi rămâne limpede. Datorită conţinutului ridicat de lipide ale peretelui, celulele sunt hidrofobe şi au tendinţa de a adera în timpul creşterii pe medii apoase. Tulpinile virulente cresc în structuri serpentiforme, în care bacilii acido-alcoolo-rezistenţi sunt aşezaţi în cordoane lungi, paralele. Formarea cordoanelor celulare reflectă virulenţa şi se datorează unui compus – trehaloza-6,6'-dimicolat (*cord factor*). Factorul "cord" a fost extras din tulpinile virulente, cu eter de petrol, este chimiotactic negativ pentru fagocite şi stimulează formarea *granuloamelor cronice.*

Micobacteriile sunt organisme strict aerobe. Creşterea presiunii parţiale a O_2 favorizează creşterea culturii. Timpul de generaţie este de circa 18 ore. Speciile saprobionte cresc mai repede şi sunt numai acido-rezistente. Metabolizează o largă varietate de compuşi simpli.

Deşi sunt nesporulate, datorită compoziţiei chimice speciale a peretelui celular, celulele de *M. tuberculosis* sunt rezistente la acţiunea factorilor fizici şi chimici. La 70°C îşi pierde viabilitatea în 10 min. În produsele patologice (sputa), rezistă 5 minute la 100°C. În lapte, bacilul tuberculos moare după 10 minute la 70°C. Lumina solară şi uscăciunea distrug rapid celulele de *M. tuberculosis*. Bacilii din spută îşi pierd viabilitatea în 14 zile, în încăperile contaminate şi expuse luminii solare, dar în încăperile întunecoase rămân infecţioşi luni şi chiar ani de zile. În praf, *M. tuberculosis* rezistă circa 10 zile, pe haine şi pe filele cărţilor – 3 luni, în noroi – 4–8 luni. În produsele patologice, agentul patogen este mult mai rezistent: cadavrele infectate şi îngropate păstrează viabilitatea *M. tuberculosis* un interval de ordinul anilor. Acidul fenic 5% distruge *M. tuberculosis* în 5 minute, iar $HgCl_2$, într-o oră.

M. tuberculosis este sensibil la acţiunea unor antibiotice şi a unor agenţi antimicrobieni de sinteză, care îi modifică metabolismul şi blochează multiplicarea, putând fi astfel mai uşor fagocitat: streptomicina, acidul paraaminosalicilic (PAS), tiosemicarbazona, hidrazida acidului izonicotinic. Toate aceste medicamente au efect bacteriostatic (blochează multiplicarea). Rezistenţa *M. tuberculosis* se poate instala repede, în funcţie de doza administrată, ceea ce face ca preparatele să devină inutilizabile.

Variabilitatea se manifestă în aspectul coloniilor, pigmentaţie, virulenţă, temperatura optimă de creştere.

Epidemiologie. M. tuberculosis şi *M. bovis* sunt la fel de virulente pentru om. Infecţia primară se face prin *aerosolii* eliminaţi de persoanele cu proces patologic evolutiv, sau pe cale digestivă, după consumul alimentelor contaminate (carne, lapte), insuficient tratate termic. Aerosolii de 1–5 μm ajung în alveole. Contactul familial şi expunerea amplă, în special a personalului medical, uşurează transmiterea bacilului tuberculos prin aerosoli.

La adult, tuberculoza evoluează de obicei prin reactivarea focarelor latente şi doar rareori, prin reinfecţie. Tuberculoza de reactivare începe în zonele cele mai aerisite ale plămânului (apexul pulmonar) şi se caracterizează prin leziuni tisulare cronice: formarea granuloamelor, cazeificarea şi fibroza. Ganglionii regionali nu se cazeifică, fiind puţin implicaţi.

Patologie. Diferitele specii de organisme au grade foarte diferite de sensibilitate la infecţia cu *M. tuberculosis*: omul şi cobaiul sunt foarte sensibile, iar păsările şi cornutele sunt rezistente. Se estimează că anual apar circa 8 milioane de cazuri noi de tuberculoză. Circa 1/3 din populaţia globului (2 miliarde) este infectată cu *M. tuberculosis*, bacilii fiind sechestraţi în granuloame mici. Majoritatea (mai mult de 90%) nu dezvoltă boala, iar restul, în condiţiile scăderii reactivităţii imunitare, dezvoltă un proces patologic tuberculos (fig. 251).

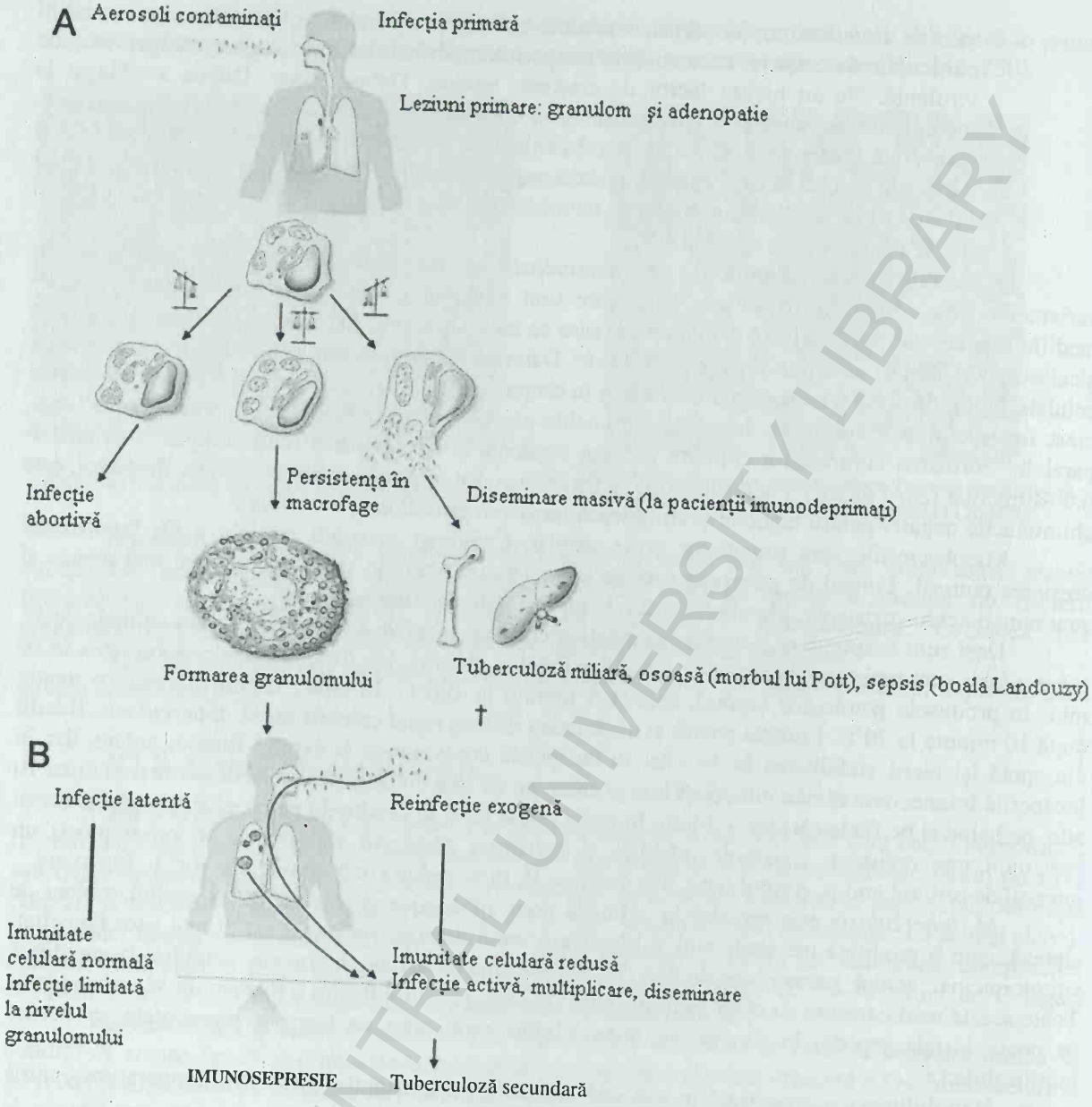


Fig. 251. Evoluția infecției tuberculoase. A). *M. tuberculosis* este inhalat odată cu aerosolii, iar după o perioadă de incubație de 4–12 săptămâni, macrofagele alveolare distrug majoritatea bacililor infectanți, însă o mică parte pot persista în macrofage. Dacă sistemul imunitar și virulența agentului infecțios sunt în echilibru, macrofagele infectate vor fi izolate prin formarea granulomului (leziunea primară). B). *M. tuberculosis* poate astfel persista în stare latentă pentru perioade lungi de timp, însă la apariția unui dezechlibru între parazit și gazdă sau prin contaminare exogenă, infecția se poate reacutiza (Ulrichs și Kaufmann, 2002).

Plămânul este sediul principal al infecției și al procesului patologic, dar bacilul se poate disemina pe cale sanguină sau limfatică, în oricare țesut. Amploarea procesului patologic este influențată de numărul bacililor din inocul, de gradul multiplicării agentului patogen și de reactivitatea imunitară a gazdei. Bacilii nevirulenți (din vaccinul BCG) supraviețuiesc în gazda imunoreactivă, un interval de luni sau câțiva ani.

După ce *M. tuberculosis* se stabilește în țesuturi, rezidă în monocite, în celulele *reticuloendoteliale** și în celulele gigante. Localizarea intracelulară favorizează persistența infecției.

* Sistemul reticuloendotelial cuprinde *fagocitele* propriu-zise, *celulele reticulare ale sinusurilor* venoase din splină și ganglioni și *celulele endoteliale* ale vaselor sanguine și limfatice.

BCU "I.C. BRĂTIANU" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Leziunile infecției cu *M. tuberculosis* sunt de două tipuri:

- tipul *exsudativ*, datorat unei reacții inflamatorii acute, cu edem, PMN, monocite, în jurul bacililor tuberculoşi pulmonari. Leziunea se poate vindeca prin absorbția edemului, sau fagocitele activate din focar îşi varsă conținutul enzimatic şi țesutul se necrozează;
- tipul *productiv*, caracterizat prin formarea *granulomului cronic*. Structural, granulomul este format din 3 zone: *centrală*, cu celule mari, multinucleate, de origine monocitară, cu bacili tuberculoşi; *intermediară*, cu celule epitelioide, adeseori orientate radiar; *periferică*, cu limfocite, monocite, fibroblaste şi fibre de colagen.

Granulomul este un țesut de răspuns la un material exogen *particulat*, dar nu este totdeauna datorat unui proces infecțios. Formarea granulomului este indusă de persistența celulelor infecțioase şi de încărcarea macrofagelor cu pulberi nedegradabile (talc, siliciu, azbest, cărbune). *Granulomul pulmonar tuberculos** este consecința persistenței celulelor de *M. tuberculosis,* atribuită unor factori care împiedică fuziunea lizosomilor cu vacuola de fagocitoză. Este o structură care izolează celulele infectate cu *M. tuberculosis* şi previne diseminarea lor.

* Plămânul este implicat în 85% dintre cazurile de tuberculoză. La persoanele imunocompetente maladia este limitată la țesutul pulmonar, deoarece, în celelalte țesuturi, diseminarea infecției este controlată de SI. La persoanele cu SIDA, tuberculoza este o maladie sistemică şi implică organe multiple.

Persistența *M. tuberculosis* se datorează incapacității macrofagelor de a deveni micobactericide.

Fagocitele activate de materialul particulat endocitat, eliberează enzime proteolitice, care produc leziuni tisulare. Primele leziuni sunt de tip *exsudativ*. Treptat, celulele infiltrate sub acțiunea factorilor din exsudat se organizează şi formează un *granulom* alcătuit din macrofage.

Reacția granulomatoasă este cea care determină efectele patologice ale infecției cu *M. tuberculosis* sau cu *M. leprae*. În funcție de structura histologică, granuloamele pot fi *imune* sau *neimune*.

Granulomul tuberculos este de natură imună, în a cărui structură, celulele SFM se diferențiază, dobândesc morfologia celor epiteliale şi se numesc *celule epitelioide* sau fuzionează şi rezultă *celule gigante*. Ele sunt celule fagocitare mononucleare şi constituie cea mai importantă caracteristică structurală a granuloamelor. Se crede că celulele epitelioide au funcție secretorie.

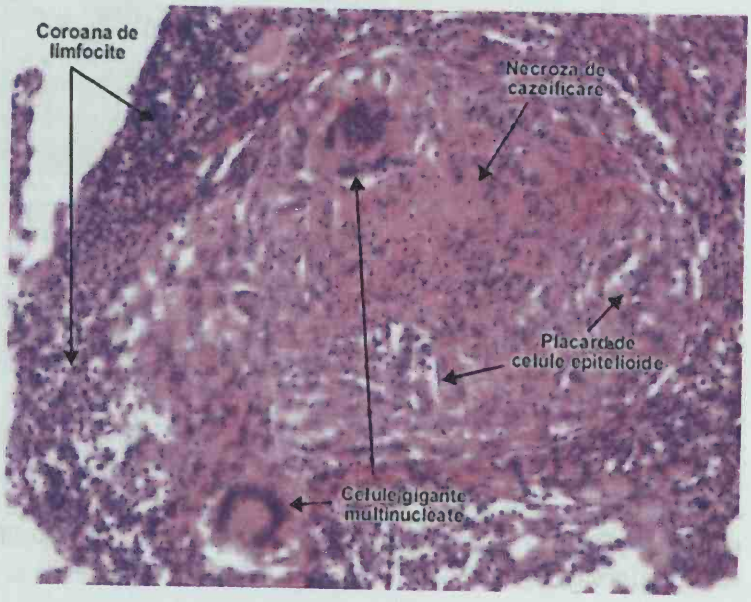


Fig. 252. Granulom giganto-epitelioid tuberculos în interstițiu. Preparat histopatologic, colorație cu hematoxilină-eozină, ob. x 4 (http://www.pathologyatlas.ro/tuberculoza-pulmonara-morfopatologie-aparat-respirator.php).

BCU IASI / CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

Celulele *gigante* din granuloamele imune sunt de tip Langhans, cu nuclei periferici, fără reticul granular.

Alte celule din structura granulomului sunt *limfocitele* şi *fibroblastele*. Sinteza *colagenului*, care duce la fibroză, este o trăsătură particulară a granulomului de hipersensibilitate. Se sintetizează prostaglandine (PG) şi citokine. Pacienţii cu granuloame imunitare şi cu silicoză au o fibroză accentuată în aria granulomului.

Răspunsul imun anti-tuberculos este indus şi generat în ţesuturile limfoide secundare care drenează situsul infecţios. Antigenele de *M. tuberculosis* sau celulele întregi trebuie să ajungă în ganglionii regionali prin limfa aferentă. Celulele dendritice (CD) trec din sânge în situsurile infecţioase, preiau antigenele de *M. tuberculosis* şi prin limfa aferentă ajung în regiunea paracorticală, unde prezintă aceste antigene limfocitelor T neinformate. Acestea migrează în focarul infecţios şi devin componente ale granulomului (fig. 253).

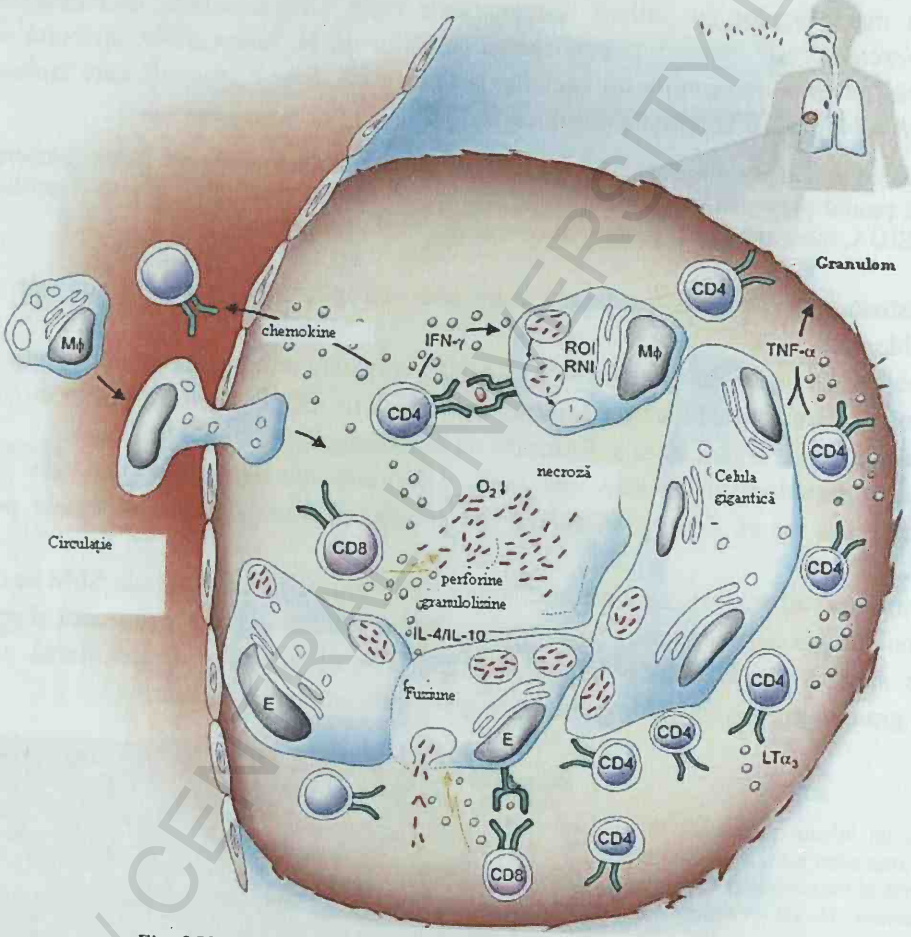


Fig. 253. Răspunsul imun al gazdei la infecţia cu *Mycobacterium tuberculosis* şi formarea granulomului (Ulrichs şi Kaufmann, 2002).

Macrofagul este o celulă esenţială a granulomului, pentru că *M. tuberculosis* rezidă exclusiv în macrofage la situsul infecţios pulmonar. Originea lor este incertă: pot să derive din macrofagele alveolare prin diviziune, dar mai probabil din monocitele sanguine. Funcţia anti-*M. tuberculosis* a macrofagelor pulmonare se exprimă numai după ce limfocitele TCD_4 şi CD_8 extravazează din sânge în alveole, la situsul infecţios. Macrofagele alveolare infectate cu *M. tuberculosis* se activează, secretă citokine proinflamatorii şi chemokine, generează NO şi O_2^- cu efect anti-bacterian, se hipertrofiază şi dobândesc caractere morfologice *epitelioide* sau *fuzionează* şi formează *celule gigante*. Ele ocupă o poziţie centrală în granulom, iar limfocitele TCD_4 şi CD_8 sunt periferice (fig. 254).

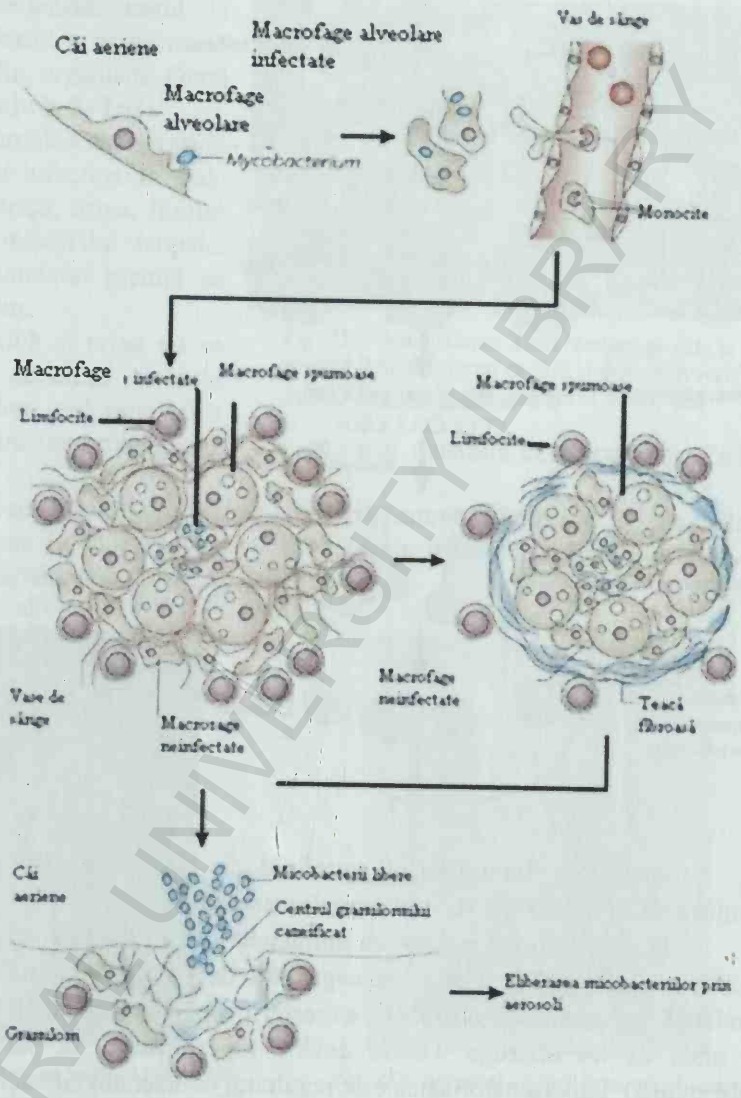


Fig. 254. Evoluția granulomului tuberculos (Russel, 2007).

Celulele T CD_8 și CD_4 stimulează imunitatea anti-*M. tuberculosis* pe mai multe căi ipotetice (fig. 255):

- secretă IFN γ, care activează macrofagul la o stare microbiostatică;
- secretă substanțe cu efect litic față de *M. tuberculosis;*
- CD_8 lizează macrofagele infectate cu *M. tuberculosis*.

În jurul celulelor din focar, *fibroblastele* proliferează și sintetizează colagen, formând un *țesut fibros* de acoperire.

Evoluția granulomului tuberculos. Granuloamele care conțin bacili de *M. tuberculosis* rămân latente pentru zeci de ani, la circa 90% dintre cei aproximativ 2 miliarde de indivizi cu infecție latentă, dar fără manifestări clinice. La restul de 10%, celulele centrale ale granulomului se lizează din mai multe cauze: lipsa O_2, proliferarea bacililor tuberculoși, acțiunea TNF și a limfocitelor Tc. După liza celulelor centrale ale granulomului, se formează *granuloame cazeoase* (de consistența cheagului de cazeină), favorabile dezvoltării celulelor de *M. tuberculosis*. După ruperea peretelui fibros, bacilii se disemineză prin contiguitate în țesutul adiacent, pe cale sanguină în alte organe, sau pe cale aeriană, la alți indivizi. Distrugerea țesutului granulomatos, ce duce la *cazeificare* și *cavitație*, este o particularitate a tuberculozei, fiind rară sau chiar absentă în celelalte granuloame, imune sau neimune.

Unul dintre factorii cazeificării este TNFα. La pacienții tuberculoși, fagocitele mononucleare eliberează cantități mai mari de TNFα, în prezența unor componente ale celulelor de *M. tuberculosis*.

Cazeificarea poate fi o trăsătură a granuloamelor cu celule epitelioide sau a gomelor sifilisului terțiar. Granuloamele de sarcoidoză nu se cazeifică.

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

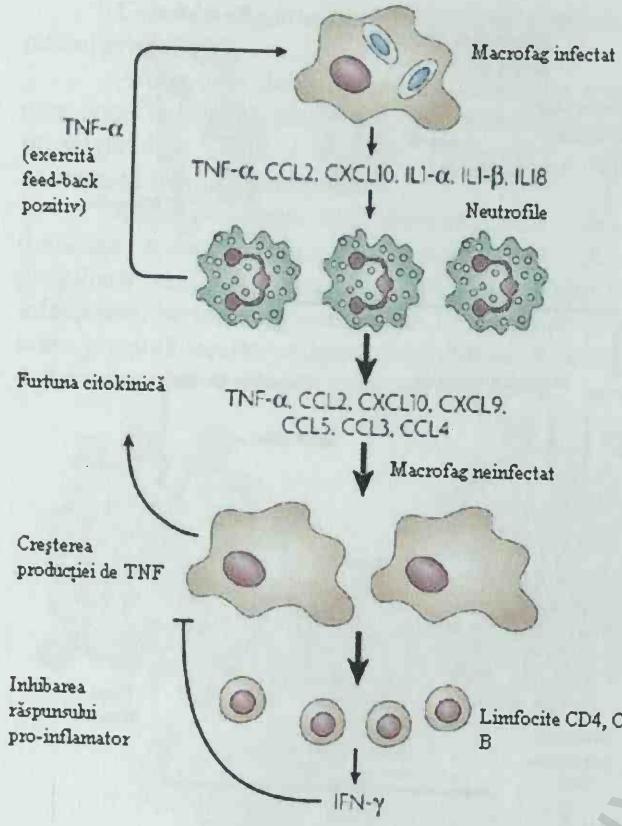


Fig. 255. Cascada citokinelor declanşată de macrofagele infectate cu *M. tuberculosis*, mediată de TNF-α. În condiţii experimentale s-a observat afluxul neutrofilelor în etapele iniţiale ale formării granulomului, care însă nu a putut fi demonstrat *in vivo*. Chemokinele eliberate sunt atractante pentru limfocite. Ele eliberează IFNγ care inhibă reacţia inflamatorie (Russel, 2007).

Asocierea granulomului epitelioid cu reacţia de HSÎ, se explică prin numărul mare de limfocite T la periferia structurii granulomatoase.

După *contactul primar* cu antigenele de *M. tuberculosis*, organismul dobândeşte o anumită rezistenţă, reflectată prin creşterea capacităţii de a localiza bacilul tuberculos şi de a limita diseminarea limfatică, pe seama activării IMC, a creşterii capacităţii monocitelor de a limita multiplicarea bacililor şi chiar de a-i distruge. Gazda devine hipersensibilă la bacilul tuberculos (reacţia pozitivă la tuberculină). Hipersensibilitatea este rezultatul contactului cu bacilii întregi sau cu amestecul proteic al tuberculinei, în asociaţie cu lipidele parietale. Hipersensibilitatea şi rezistenţa sunt aspecte distincte ale reactivităţii mediate celular.

Reactivitatea organismului faţă de *M. tuberculosis* se evaluează prin *testul tuberculinei*. Pentru acest test se foloseşte preparatul vechi (germ. *alt* = engl. *old tuberculin*) sau derivatul proteic purificat (PPD). *Alt tuberculin* este filtratul acelular, concentrat, al culturii de *M. tuberculosis* în mediu lichid, de 6 săptămâni. Este un amestec de proteine, la care se adaugă o varietate de compuşi celulari şi din mediul de creştere. PPD se obţine prin fracţionarea chimică a preparatului *alt tuberculin* şi este standardizată din punctul de vedere al reactivităţii biologice, exprimată în unităţi de tuberculină.

Diagnostic. Testul pozitiv la tuberculină nu este dovada tuberculozei active. La un individ fără contact anterior cu antigenele de *M. tuberculosis*, reacţia la tuberculină este absentă. La persoanele care au parcurs etapa infecţiei primare, la locul injectării tuberculinei se produce induraţie, edem şi eritem în 24—48 de ore, cu reacţie inflamatorie foarte intensă, chiar cu necroză centrală. Testul reacţiei la tuberculină se citeşte la 48–72 de ore şi este considerat pozitiv dacă injectarea a 5 unităţi de tuberculină produce o induraţie cu diametrul de cel puţin 10 mm (o unitate de tuberculină este activitatea conţinută într-o greutate specificată, într-un tampon specific). Testul pozitiv persistă câteva zile.

Testul la tuberculină devine pozitiv la 4–6 săptămâni după infecţie sau după vaccinare. Tuberculina are efecte negative la pacienţii tuberculoşi datorită activării reacţiei de hipersensibilitate celulară, la cei cu infecţie rujeolică, cu boala Hodgkin, la pacienţii SIDA şi la cei imunosupresaţi.

BCU TIMIŞOARA / CENTRUL UNIVERSITY LIBRARY

După tratamentul cu izoniazidă, testul la tuberculină poate deveni negativ. Testul se negativează numai după eliminarea bacililor din organism. După vaccinarea BCG, testul devine negativ la 3–7 ani.

Evidențierea bacilului tuberculos este dovada prezumptivă a existenței procesului infecțios. Probele analizate sunt sputa, spălătura gastrică, urina, fluidul pleural, LCR, lichidul articular, materialul biopsic, sângele. Frotiul din spută din exsudatul pleural se colorează după metoda Ziehl-Neelsen.

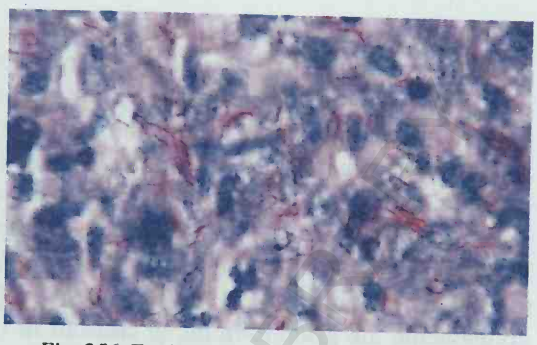


Fig. 256. Frotiu colorat Ziehl Neelsen pe care se observă BAAR colorați în roșu și grupați în corzi (http://img.medscape.com/fullsize/migrated).

Lichidul de spălătură gastrică și urina nu se recomandă pentru colorare, deoarece conțin micobacterii saprobionte care dau colorație fals pozitivă. Microscopia cu fluorocromi (auramină, rodamină) este mai sensibilă decât colorația Ziehl-Neelsen.

Cultivarea pe mediul lichid selectiv este o metodă sensibilă pentru diagnosticul de certitudine al procesului infecțios. În paralel se inoculează mediul Lowenstein-Jensen. Mediile inoculate se incubează la 35–37°C, pentru 8 săptămâni (fig. 257, 258).

Fig. 257. Aspectul coloniilor de *M. tuberculosis* pe mediu Lowenstein – Jensen (http://www.cosmosbiomedical.com/education/bacteriology/TB).

Fig. 258. Aspectul culturii unei micobacterii cromogene pe mediu L-J – *M. phlei*

Metodele clasice de identificare au în vedere rata de creștere, morfologia coloniilor, pigmentația, profilul biochimic și necesită 6-8 săptămâni. Tulpinile fotocromogene produc pigment la lumină, cele scotocromogene, la întuneric, iar cele necromogene nu se pigmentează.

Metodele moleculare de identificare sunt rapide și sensibile. Probele de ADN care codifică ARNr se folosesc pentru metoda hibridării.

Metoda HPLC se bazează pe identificarea acizilor micolici, variabili de la o specie la alta.

Metoda PCR se folosește pentru detectarea ADN de *M. tuberculosis* în probele clinice.

În 1927, Calmette și Guerin, după numeroase pasaje, au obținut o tulpină atenuată de *M. bovis*, folosită ca vaccin BCG, cu o bună eficiență protectoare pentru prevenirea tuberculozei miliare la copii. La tulpina mutantă din BCG lipsesc 129 de gene, comparativ cu tulpinile virulente de *M. tuberculosis*, considerate ca gene esențiale pentru virulență.

Pentru identificarea bacteriilor acido-alcoolo-rezistente se folosește metoda colorației Ziehl-Neelsen. Pe frotiurile din spută sau din țesut, *Mycobacterium* se evidențiază după colorare cu fluorocromi (auramină sau rodamină).

Tratamentul constă în administrarea chimioterapiei specifice. Mutantele rezistente apar cu o frecvență relativ mare: $1/10^6$–10^8 celule sunt mutante spontane rezistente la medicația de primă linie (izoniazida și rifampin). Medicamentele administrate singure selectează foarte repede mutantele rezistente. De aceea, tratamentul se face cu combinații de medicamente, cu o rată de vindecare de peste 95%.

M. avium complex (MAC), denumit şi *M. intracellulare* (MAI) este cel mai comun agent infecţios oportunist la pacienţii imunocompromişi (SIDA), după ce numărul limfocitelor TCD_4 scade sub 100/μL. Temperatura optimă de creştere este de 41°C. Tulpinile MAC sunt ubicuitare în mediile naturale: fiind izolate din sol, ape, alimente, animale, inclusiv de la păsări.

M. leprae a fost descris de Hansen (1873). Bacilii sunt acidorezistenţi şi cresc în cordoane paralele sau în aglomerări globulare. La pacienţii cu lepră lepromatoasă, *M. leprae* se găseşte în raclajul tegumentar, al mucoaselor, în celulele endoteliale ale vaselor şi în celulele mononucleare. Leziunile sunt localizate în ţesuturile reci: tegument, nervi superficiali, faringe, laringe, globul ocular, testicule. Tulburările nervoase se datorează infiltrării filetelor nervoase cu monocite şi limfocite, componente ale granulomului, şi constau în tulburări de sensibilitate, ulcere trofice, resorbţie osoasă, scurtarea degetelor.

Infecţia leproasă se manifestă cu un spectru larg de variaţie a amplitudinii leziunilor, între cele două forme extreme:

- *lepra leproidă,* cu evoluţie gravă, asociată cu leziuni teumentare nodulare multiple, un număr enorm de bacili de *M. leprae* în granuloamele lepromatoase (peste 10^{10}/g de ţesut) şi implicare sistemică a nervilor. Testul la lepromină este negativ sau slab pozitiv. Proliferarea bacililor produce leziuni tegumentare distribuite difuz sau localizate în noduli. Granuloamele sunt formate din macrofage inactive, gigante, provenite prin fuziune, încărcate cu bacili. Lipseşte infiltratul limfocitar, ceea ce dovedeşte absenţa IMC. Tegumentul este infiltrat cu celule T supresoare. S-a demonstrat *anergia celulelor T*, cu specificitate faţă de antigenele bacilului leprozei. Anergia IMC este explicată prin predispoziţia genetică, prin deleţia clonală a celulelor T specifice faţă de antigenele de *M. leprae* şi prin funcţia inhibitorie a celulelor Ts specifice. Macrofagele sunt pline cu bacili şi chiar după chimioterapie prelungită, aceştia sunt eliminaţi lent.
- *lepra tuberculoidă*, cu evoluţie favorabilă, neprogresivă, este o maladie localizată, cu granuloame tegumentare bine organizate, cu macrofage cu citoplasma spumoasă, celule epitelioide şi celule gigante Langhans active, care omoară şi digeră bacilii de *M. leprae*. Infiltratul limfocitar al granulomului este intens, cu predominanţa limfocitelor TCD_4, care secretă IFNγ. Interferonul activează macrofagele din focar, care devin astfel capabile să inhibe creşterea şi diviziunea celulelor de *M leprae*. La periferia granulomului se găsesc limfocite TCD_8. Testul la lepromină este pozitiv, iar IMC este funcţională. Leziunile nervilor se datorează proliferării bacililor şi răspunsului IMC în situsuri adiacente filetelor nervoase.

Infecţia se transmite, probabil, datorită contactului prelungit al copilului mic, cu persoanele care elimină un număr mare de bacili.

Bibliografie selectivă

1. http://www.med.cmu.ac.th/dept/pediatrics/06-interest-cases/ic-8-nocardia/case3.htm
2. Hastings Robert C., Gillis P. Thomas, Krahenbull James L. and Franzblau Scott G. 1988. Leprosy. Clin. Microbiol. Rev. 1, 3.
3. http://img.medscape.com/fullsize/migrated/461/965/
4. http://www.asm.org/division/c/photo/nocard1.JPG)
5. http://www.cosmosbiomedical.com/education/bacteriology/TB
6. http://www.flickr.com/photos/euthman/2111203428/)
7. http://www.pathologyatlas.ro/tuberculoza-pulmonara-morfopatologie-aparat-respirator.php
8. http://www1.ams.cmu.ac.th/depts/clinmcrb/CMBwebsite
9. Russell D. G. 2007. Who puts the tubercle in tuberculosis? Nature Reviews Microbiology 5, 39-47
10. Ulrichs T., Kaufmann S. H. E. 2002. Mycobacterial persistence and immunity. Frontiers in Bioscience 7:458–469.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

11. INFECŢII PRODUSE DE BACTERII ANAEROBE REZIDENTE ÎN MICROBIOTA NORMALĂ

Bacteriile anaerobe fac parte din *microbiota normală* şi se găsesc pe tegument, pe suprafaţa mucoasei orale şi a tractului gastrointestinal. Unele specii sunt aerotolerante şi cresc chiar în aerul atmosferic, dar au metabolism anaerob. Bacteriile obligat anaerobe nu au sisteme moleculare protectoare faţă de radicalii toxici ai O_2: nu au SOD şi nici catalază şi se izolează doar rareori din focarele infecţioase umane. Cele mai multe infecţii anaerobe la om sunt provocate de bacterii *anaerobe* care tolerează concentraţii mici de O_2 în mediu.

Tabelul 26.

Bacterii anaerobe, altele decât genul *Clostridium*, întâlnite în patologia umană (Brook, 2008).

Specii microbiene anaerobe	Surse de izolare
Coci Gram pozitivi	
Peptostreptococcus spp.	Tractul respirator, infecţii intra-abdominale, infecţii subcutanate
Streptococi microaerofili	Sinuzite, abcese craniene
Bacili Gram pozitivi- nesporulaţi	
Actinomyces spp.	Abcese intracraniene, pneumonii, infecţii ORL
Propionibacterium acnes	Infecţii cardiace şi intracraniene
Bifidobacterium spp.	Otite
Bacili Gram negativi	
Bacteroides fragilis grup (Bacteroides fragilis, B. thetaiotamicron)	Infecţii intra-abdominale, infecţii ale tractului genital la femei, infecţii neonatale, sepsis
Prevotella spp., Porphyromonas spp.	Infecţii orofaciale, pneumonii, peritonite
Prevotella oralis	Infecţii orofaciale
Prevotella B. oris-buccae	Infecţii orofaciale şi intra-abdominale
P. bivia, P. disiens, Fusobacterium spp.	Infecţii ale tractului genital la femei
F. nucleatum	Infecţii orofaciale, respiratorii, abcese intracraniene
F. necrophorum	Pneumonii.

Fiind bacterii componente ale microbiotei normale, infecţia se produce atunci când anaerobii sau alte specii ale microbiotei contaminează situsuri care în mod normal sunt sterile.

Procesele infecţioase provocate de bacteriile anaerobe sunt de obicei polimicrobiene, anaerobii fiind asociaţi cu anaerobi facultativi (tabelul 26). De exemplu, într-o infecţie abdominală (o peritonită), *E. coli* consumă repede O_2 disponibil şi îşi modifică metabolismul devenind anaerobă. Mediul anaerob cu potenţial redox scăzut favorizează creşterea bacteriilor anaerobe.

Bacterii Gram negative

Speciile de *Bacteroides* formează un grup mare de bacili Gram negativi sau cocobacili (fig. 259). Multe specii ale genului *Bacteroides* au fost reclasificate în g. *Prevotella* şi *Porphyromonas*.

B. fragilis formează populaţii dense în colon (10^{11} celule/gram) şi se izolează din infecţiile supurative produse prin contaminarea cu conţinut intestinal (peritonita datorată leziunilor apendicelui sau ale colonului) (Finegold şi colab., 1983).

În infecţiile intraabdominale, speciile de *Bacteroides* sp. sunt asociate cu coci anaerobi (*Peptostreptococcus* sp.), cu bacili anaerobi Gram pozitivi (*Clostridium* sp.) şi cu facultativ anarobi din microbiota normală.

Fig. 259. Bacteroides spp. pe frotiuri colorate Gram (www.answers.com/topic/bacteroides).

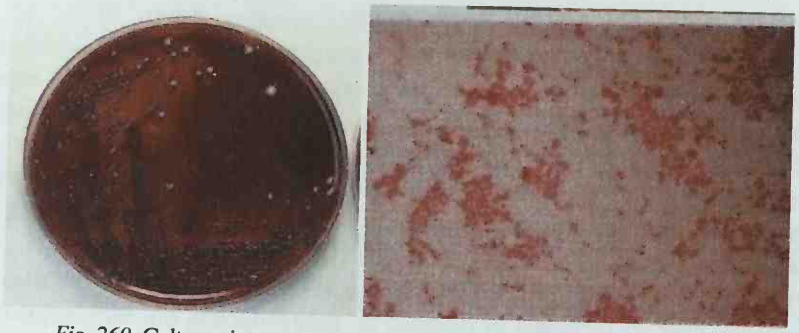


Fig. 260. Cultura pigmentară de *Prevotella melanogenica* pe geloză sânge (http://pemburumikroba.blogspot.com//kuman-anaerob) şi morfologia pe frotiu colorat Gram (http://web.inonu.edu.tr/~bdurmaz/Prevotella.htm).

Grupul *B. fragilis* se deosebeşte de ceilalţi bacili Gram negativi anaerobi prin capacitatea de a creşte pe mediu cu concentraţii ridicate (20%) de bilă, deoarece intervine în deconjugarea acizilor biliari primari. Este catalază şi indol pozitiv, rezistent la kanamicină, vancomocină şi colistin (Tudor şi colab., 1999).

Bacilii Gram negativi anaerobi din genurile *Prevotella* (fig. 260) şi *Porphyromonas* formează colonii pigmentate cu fluorescenţă roşie în UV, sunt sensibili la săruri biliare, vancomicină şi colistin, necesită pentru creştere hemină şi vitamina K şi sunt catalază negativi. *Prevotella sp.* fermentează zaharurile, spre deosebire de *Porphyromonas* sp. *Prevotella* cuprinde mai multe specii*: P. bividia, P. buccae, P. denticola, P disiens, P. intermedia, P. melaninogenica, P. oralis. Porphyromonas: P. asaccharolytica, P. endodontalis, P. gingivalis.* Aceste microorganisme au fost izolate din infecţii ale tractului respirator, subcutanate, aspirate bronşice, otite cronice, sinuzite şi abcese ale cavităţii bucale.

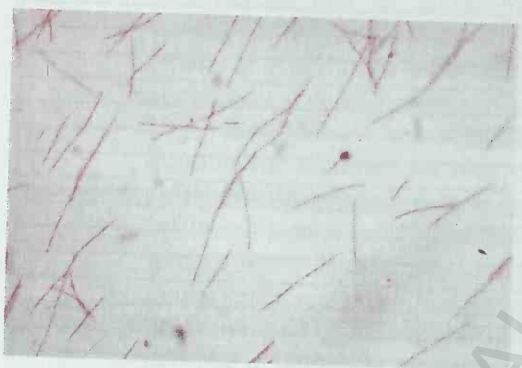


Fig. 261. Fusobacterium spp. Morfologia pe frotiul colorat Gram (www.asm.org/Division/c/Gramneg.htm).

Speciile de *Fusobacterium* sunt bacterii Gram negative pleomorfe (fig. 261), cresc pe medii cu 20% bilă, sunt catalază negative, sensibile la kanamicină, colistin şi penicilină, dar rezistente la vancomicină. Speciile cel mai adesea întâlnite în clinică sunt *F. necrophorum* şi *F. nucleatum. F. nucleatum* produce indol şi lipază, nu reduce nitraţii. *F. necrophorum* produce colonii β- hemolitice pe geloză sânge. Cele mai multe specii produc acid butiric şi convertesc treonina în acid propionic. Se izolează din infecţiile anaerobe polimicrobiene, dar în osteomielită pot fi în cultură pură.

Patogenitatea bacililor Gram negativi anaerobi este condiţionată de prezenţa capsulei polizaharidice (la *B. fragilis* şi *P. melanogenica),* a pililor cu rol în aderenţă şi colonizare (la *B. fragilis, B. ovatus* şi *Porphyromonas gingivalis*), a endotoxinelor cu rol în apariţia infecţiilor supurative, a enzimelor histolitice de tipul hialuronidazei, colagenazei, neuraminidazei, heparinazei, fibrinolizinei (produse de speciile de *Bacteroides),* a fosfolipazei A (produsă de *Prevotella melaninogenica* şi *P. intermedia*), a hemaglutininelor (produse de *Porphyromonas gingivalis*) sau a enzimelor cu rol în protejarea bacteriilor faţă de mecanismele de apărare ale gazdei (superoxid dismutaza) şi a acidului succinic, care inhibă fagocitoza.

Cocii Gram negativi anaerobi sunt incluşi în genul *Veillonella* (cu morfologie asemănătoare cu *Neisseria*) (fig. 262), *Acidaminococcus* şi *Megasphaera*, fiind izolaţi din bacteriemii, infecţii ginecologice, abcese şi infecţii ale plăgilor, endocardite şi sinuzite.

Fig. 262. Veillonella sp. Morfologia celulelor pe frontiul colorat Gram (www.atsu.edu/.../chamberlain/Website/gallery.htm).

Bacterii Gram pozitive

Genul *Actinomyces* cuprinde bacili Gram pozitivi ramificaţi sau filamentoşi nesporulaţi, imobili microaerofili sau strict anaerobi, catalază, indol,

urează, lipază și DN-ază negativi, care formează pe geloză sânge colonii mari, pigmentate, rugoase, aderente la mediu, ce apar după 6–21 de zile de incubare. Cele mai frecvente specii componente ale microbiotei orofaringiene sunt: *A. israelii, A. naeslundii, A. viscosus, A. odontolyticus* şi *A. meyeri.*

Actinomyces israelii şi *A. naeslundii* sunt componente minore ale microbiotei orale şi a tractului digestiv, care pot iniția un proces infecțios cronic, supurativ, granulomatos, fiind izolate din abcese intracraniene, mastoidite cronice, pneumonii și peritonite. *Actinomyces israelii* produce actinomicoza. Filamentele pot fi scurte și măciucate sau lungi, subțiri, ramificate sau neramificate. Este un anaerob aerotolerant. Pe frotiul din leziunea granulomatoasă piogenă se disting granule formate din componente celulare ale țesutului şi microcolonii bacteriene. În granulomul infecțios se găsesc şi alte bacterii din microbiota orală: *Actinobacillus actinomycetemcomitans, Haemophilus aphrophilus, Eikenela corodens, Capnocytophaga* etc. Procesul infecțios este inițiat în zonele traumatizate ale mucoaselor. *A. israelii* este facultativ anaerob şi creşte în atmosferă cu CO_2.

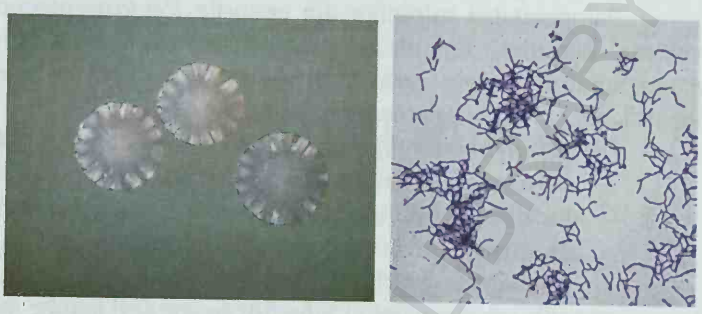


Fig. 263. Actinomyces spp. Morfologia coloniilor (stânga) şi a celulelor pe frotiul colorat Gram (dreapta) (http://commons, wikitovet.blogspot.com/2006_12_01_archive.html).

Pentru *diagnostic*, se examinează puroiul din leziunile granulomatoase pentru prezența structurilor granulare. Granulele sunt tari, lobulate, alcătuite din macrofage şi alte componente tisulare, filamente bacteriene măciucate corineforme şi mici concrețiuni de sulf elementar, formate prin oxidarea H_2S rezultat din metabolismul aminoacizilor cu sulf. *A. israelii* creşte pe bulion cu tioglicolat incubat anaerob sau în atmosferă cu CO_2. *A. israelii* este un component al microbiotei endogene şi nu poate fi eliminat. Persoanele care fac infecții recurente trebuie să primească preventiv tratament cu penicilină, în special înainte de extracțiile dentare.

Genul *Mobiluncus* cuprinde bacili strict anaerobi, mobili, curbați, care pot apărea adesea colorați Gram negativ. Sunt agenți etiologici ai vaginitelor, adesea în asociere cu alte microorganisme anaerobe sau cu *Gardnerella spp.*, sunt sensibili la ampicilină sau eritromicină.

Genul *Lactobacillus*, componentă majoră a microbiotei normale vaginale, produce acid lactic care menține valoarea acidă a pH local. Infecțiile sunt foarte rare.

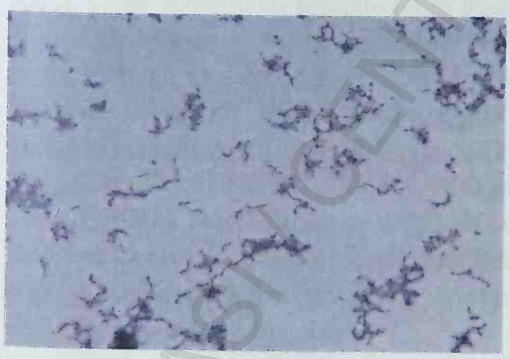


Fig. 264. Celule pleomorfe de *Propionibacterium* http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0f/Propionibacterium_acnes.jpg

Din grupul corinebacteriilor anaerobe fac parte speciile de *Propionibacterium*, unele dintre ele rezidente pe tegument. *Propionibacterium* sp. (acidul propionic este unul dintre produsele finale ale metabolismului), din microbiota normală a tegumentului, produce infecții dacă este introdus în țesuturi odată cu materialele plastice din catetere şi este implicat în infecția *acneică*. Celulele sunt pleomorfe: bacili curbați, măciucați, forme lungi colorate neuniform, cocobacili sau forme sferice (fig. 264). *P. acnes* este aerotolerant (creşte în prezența O_2 la presiunea atmosferică). Procesul patologic al acneii este mediat de lipazele extracelulare care scindează acizii graşi din lipidele tegumentare. *P. acnes* utilizează acizii graşi ca sursă de carbon şi energie, se multiplică în glandele sebacee şi determină procesul inflamator cu hiperemie şi aflux de leucocite, producând leziunile eritematoase tegumentare.

Genul *Eubacterium* cuprinde specii recunoscute ca agenți ai leziunilor periodontale, în infecțiile asociate cu dispozitive intrauterine, respiratorii mixte, de plagă şi în bacteriemii la pacienții imunodeprimați.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Cocii Gram pozitivi anaerobi cuprind specii de *Peptococcus, Peptostreptococcus* şi tulpini de streptococi microaerofili, catalază – pozitive sau negative, fermentative, izolate din infecţii ale cavităţii bucale, tractului gastro-intestinal, abcese subcutanate şi din infecţii pulmonare.

Patogenitatea tulpinilor din genurile *Peptostreptococcus* şi *Peptococcus* este determinată de prezenţa capsulei, enzimelor proteolitice şi a unor proteine de suprafaţă care inactivează imunoglubulinele, prin legarea de lanţurile uşoare ale acestora, de unde numele de proteină L (identificată la *Peptostreptococcus magnus*).

Diagnosticul infecţiilor anaerobe se bazează pe următoarele aspecte:

- mirosul greu, datorat produselor metabolismului anaerob (acizi graşi cu catenă scurtă);
- localizarea proceselor infecţioase anaerobe în vecinătatea unei structuri mucoase, deoarece anaerobii sunt componente ale microbiotei normale şi invazivitatea este minimă;
- producerea gazelor (CO_2, H_2) în focarul infecţios;
- cultivarea agentului infecţios în condiţii aerobe nu este urmată de creştere.

Tratamentul infecţiilor cu bacterii anaerobe presupune antibioterapie (tabelul 27), asociată cu drenajul chirurgical al colecţiei purulente închise.

Tabelul. 27.

Antibiotice recomandate în cazul infecţiilor cu bacterii anaerobe.

Coci Gram pozitivi anaerobi	Coci Gram negativi anaerobi	Bacili Gram negativi anaerobi	Bacili Gram pozitivi anaerobi
penicilină, cefalosporine, clindamicină, vancomicină	penicilină, cefalosporine, cloramfenicol, clindamicină, vancomicină, imipenem, sparfloxacină	penicilină La tulpinile producătoare de penicilinaza: metronidazol, cloramfenicol, clindamicină, imipenem, cefoxitin şi combinaţii cu inhibitori de β-lactamaze (amoxicilină – clavulanat, ampicilina – sulbactam, ticarcilina – clavulanat)	penicilină, cefalosporine, eritromicină, lincomicină, clindamicină, vancomicină, rifampicină, sparfloxacină
	Nu se folosesc ciprofloxacina şi metronidazolul.	Nu sunt eficiente aminoglicozidele, cotrimoxazolul, cefalosporinele de generaţia III – a, qinolonele şi monobactamii.	Nu se recomandă metronidazolul (majoritatea bacililor sunt rezistenţi).

Bibliografie selectivă

Finegold S. M., Sutter V. L., Mathisen G. E. 1983. *Normal indigenous intestinal microbiota*,. In D. J. Hentges (ed.), *Human intestinal micromicrobiota in health and disease*.Academic Press, New York. pp. 3–31

Gram(http://web.inonu.edu.tr/~bdurmaz/Prevotella.htm

http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/strandwi_phi;

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Actinomyces_spp_01.jpg

http://pemburumikroba.blogspot.com//kuman-anaerob

http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0f/Propionibacterium_acnes.jpg

tovet.blogspot.com/2006_12_01_archive.html

http://web.inonu.edu.tr/~bdurmaz/Prevotella.htm

http://www.biolib.cz/en/image/id27230

Tudor A., Dragan M. 1999. Boli Infecţioase- Curs pentru studenţii facultăţilor de stomatologie, Editura Didactică şi Pedagogică, Bucureşti, ISBN 973-30-5575-1, pp. 365–383

www.asm.org/Division/c/Gramneg.htm

www.atsu.edu/.../chamberlain/Website/gallery.htm.

BCU IASI / UNIVERSITY LIBRARY

12. BACTERII SPIRALATE DE IMPORTANŢĂ MEDICALĂ

12.1. Familia Vibrionaceae

Familia *Vibrionaceae* cuprinde patru genuri: *Vibrio, Photobacterium, Aeromonas* şi *Plesiomonas.*

La om, vibrionii produc atât infecţii intestinale, cât şi extraintestinale (Bergey's, 2005). Dintre membrii acestei familii cei mai importanţi aparţin genului *Vibrio*, remarcabili prin potenţialul lor epidemic, specia *V. cholerae* fiind agentul patogen al holerei.

12.1.1. Genul *Vibrio*

Genul *Vibrio* include bacili Gram negativi, drepţi sau curbaţi, nesporulaţi, în general necapsulaţi, mobili în medii lichide datorită flagelilor (mono- sau lofotrihi) înveliţi într-o membrană tecală ce se continuă cu membrana externă a peretelui celular. Unele specii, pe medii solide, pot sintetiza flageli peritrihi. Sunt bacili facultativ anaerobi, cu metabolism chemoorganotrof fermentativ şi oxidativ, cresc în medii ce conţin D-glucoză şi clorură de amoniu. Cu puţine excepţii, fermentează glucoza fără producere de gaz. Sunt oxidazo-pozitivi.

Membrii genului *Vibrio* sunt sensibili la acţiunea 2,4-diamino-6,7-diizopropil pteridina (agentul vibriostatic O/129) (caracter de diferenţiere faţă de genul *Aeromonas*). Raportul guanină/citozină din ADN se situează între 38–51%.

Membrii genului *Vibrio,* indigeni ai apelor estuarine, marine sau salmastre necesită concentraţii de cationi (mai ales Na^+, K^+, Mg^{2+}) mult mai mari decât microorganismele „terestre". Cele mai multe specii sunt halofile. De aceea cresc foarte greu în medii ce conţin sub 0,5% clorură de sodiu. Chiar speciile cu ascendenţă în mediul acvatic marin (*V. cholerae* şi *V. mimicus*), adaptate însă la intestinul uman (concentraţie locală NaCl 0,85%) şi considerate singurele specii „terestre", necesită pentru o bună creştere, 1%–3% NaCl. Concentraţia optimă şi toleranţa maximă la clorura de sodiu diferă în funcţie de specie. Agarul nutritiv din a cărui compoziţie a fost exclusă clorura de sodiu, îmbogăţit cu sânge sau bulion de cord-creier, permite creşterea, dat fiind aportul de clorură de sodiu din substratul adăugat. Majoritatea vibrionilor cresc între pH 5,6 şi 9,6 cu un optimum de 7,6–8,6. Comparativ cu alţi bacili Gram negativi, au rate de creştere şi de dezvoltare mult mai rapide. Speciile patogene pentru om cresc şi se dezvoltă bine între 30–37°C. Nu cresc la +4°C, dar pot supravieţui la această temperatură în stare dormantă (necultivabilă) devenind din nou cutivabili prin trecere pe un organism viu uman sau animal.

Epidemiologia şi Microbiologia medicală rămân interesate mai ales de speciile patogene pentru om.

În ultimile două decenii, la categoria tulpinilor de *V.cholerae* holerigene s-au adăugat şi unele serogrupuri non O:1/non O139, purtătoare de gene pentru toxina holerică şi epidemiogene, responsabile de epidemii de holeră în diferite zone ale globului.

Alte specii de vibrioni:

V. mimicus (face trecerea între vibrionii nonhalofili tip *V. cholerae* şi vibrionii halofili) produce diaree „*cholera-like*";

Vibrioni halofili

V. mimicus produce diaree „*cholera-like*";

V. parahemolyticus determină gastroenterita, toxiinfecții alimentare, infecții ale țesuturilor moi;

V. fluvialis, V. holissae, V. furnissi determină diaree;

V. alginolyticus produce infecții ale țesuturilor moi;

V. vulnificus – infecții, septicemii la alcoolici, la bolnavii cu hepatite cronice.

Caracterizarea morfologică, biochimică și genetică a vibrionului holeric

Principala specie patogenă pentru om, *V. cholerae* sau *V. comma*, cum a fost denumită în 1884 de cel ce a pus-o în evidență și a considerat-o agentul etiologic al holerei (R. Koch), a fost divizată în vibrioni holerici de grup O:1 și vibrioni holerici de grup non O:1 (>200). Deosebirea are la bază structura antigenică, antigenul lipopolizaharidic somatic O, specific fiecărui grup.

Cele holerigene determină holera și se încadrează în serogrupurile O:1 și O:139, în timp ce alte serogrupuri (non O:1, non:O139) produc, diaree *cholera-like,* gastroenterite, infecții ale țesuturilor moi; serogrupurile holerigene sintetizează toxina holerică, răspunzătoare de simptomele grave din infecția holerică, având în același timp o mare capacitate de răspândire în mediul extern (sunt înalt epidemiogene). Trebuie adăugat că tulpinile de *V. cholerae* holerigene serogrup O139 pot fi răspunzătoare și de cazuri de septicemii, care se explică prin înalta invazivitate a acestor tulpini datorită prezenței capsulei.

Tulpinile cu specificitate somatică O:1 pot aparține celor trei serotipuri cunoscute, în funcție de ponderea cantitativă a unor fracțiuni antigenice de natură proteică notate de la A la M (importante pentru diagostic fiind de regulă numai A, B și C) constituente ale antigenului somatic O:1: Inaba (prezintă antigene A și C), Ogawa (are antigene A și B) și Hikojima (prezintă antigene A, B și C).

Diagnosticul/caracterizarea unei tulpini de *V. cholerae* O:1și implicit denumirea corectă va cuprinde:

- specia: *Vibrio cholerae*;
- serogrupul: O:1 sau non O:1;
- serotipul: Inaba, Ogawa, Hikojima, aplicabil doar pentru serogrupul O:1;
- biotipul: cholerae (clasic) sau ElTor, aplicabil de asemenea doar pentru serogrupul O:1.

De menționat că separarea în cele două biotipuri, sau mai nou, biovarietăți, nu are la bază structura antigenică, ci unele caractere biochimice, fenotipice: reacția Voges-Proskauer, aglutinarea hematiilor de găină, prezența hemolizinei, precum și sensibilitatea/rezistența la polimixină și la acțiunea fagului IV Mukerjee (setul de fagi biotip clasic).

Până nu demult, doar serogrupului O:1 i se recunoscuse capacitatea holerigenă, ceea ce presupunea:

- prezența specificității O:1;
- prezența fracțiunilor antigenului somatic O definitorii pentru cele trei serotipuri;
- prezența caracterelor fenotipice caracteristice biotipului.

Din 1992 însă, emergența unei noi tulpini holerigene cu același potențial epidemic, lipsită de specificitatea O:1, aparținând grupului mare și heterogen non O:1 (serogrupul O:139 Bengal), s-a adăugat grupului O:1. Serogrupului O:139 Bengal i s-a recunoscut capacitatea holerigenă, prezența lui în teritoriu impunând notificarea internațională (OMS) (fig. 265).

Holera poate fi asimptomatică (75% din cazuri) și simptomatică (25%). Cazurile clinice se pot manifesta sub formă de tulburări diareice ușoare (18% din cazuri), moderată (5% din cazuri) și gravă (necesită obligatoriu spitalizare) cu scaune numeroase apoase până la aspect riziform, vomă, crampe abdominale, deshidratare masivă, șoc hipovolemic și chiar exitus (prin deshidratare).

Din punct de vedere clinic, cazurile de holeră produsă de tulpinile *V.cholerae* O:1 și O:139 au aceeași simptomatologie clinică.

ROMANIAN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

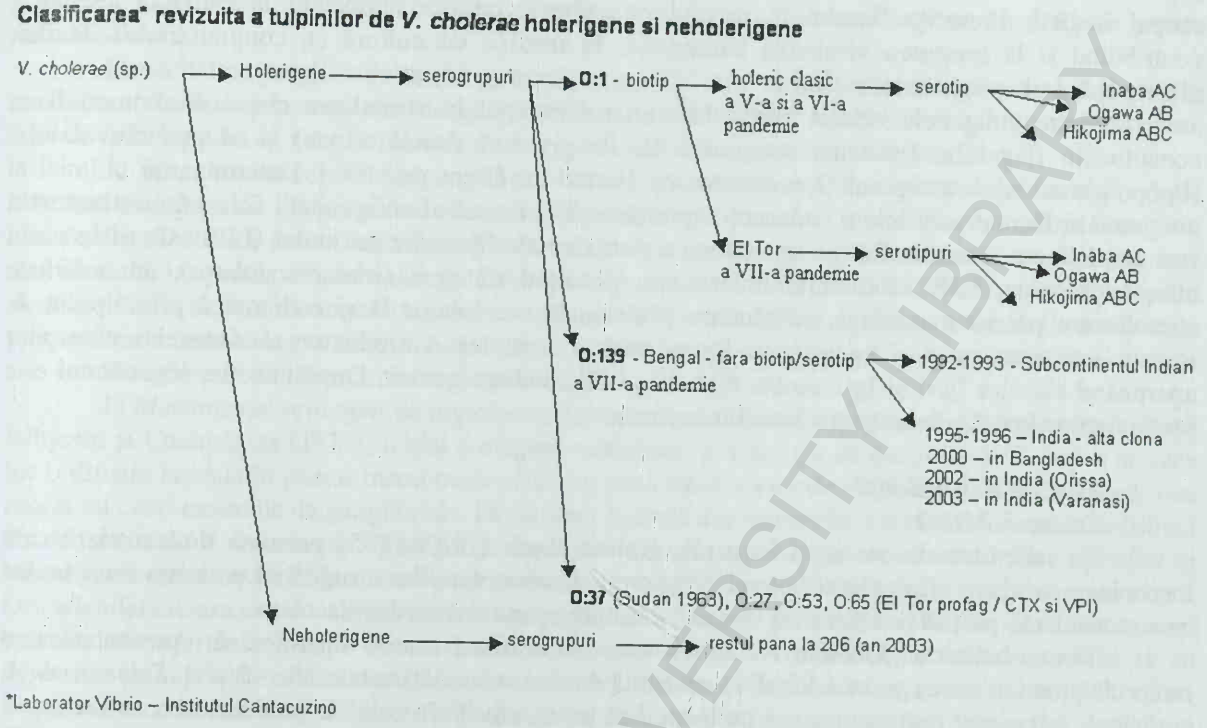


Fig. 265. Clasificarea tulpinilor de *V.cholerae* holerigene şi nonholerigene.

Grupul non O:1 cuprinde tulpini clasificabile dupa specificitățile antigenice „O". Anterior au fost desemnați cu denumirea generică de vibrioni neholerigeni (*non cholerae vibrios* = NCV) sau non-aglutinabili cu serul bivalent de grup O:1 (*non aglutinable vibrios* = NAG).

În ceea ce priveşte habitatul vibrionului holeric, există mai multe surse care pot constitui rezervoare de infecție: omul bolnav cu forme clinice aparente sau inaparente (eliminarea vibrionilor prin scaune şi vomă), mediile acvatice marine şi estuarine în care vibrionii holerici sunt indigeni, asociați cu organisme vii (zooplanctonice, crustacee) sau plante acvatice.

Poarta de intrare este digestivă, vibrionii fiind introduşi în organism pe cale orală, odată cu apa, cu alimentele contaminate sau prin intermediul mâinilor murdare.

Din punct de vedere morfologic, vibrionii holerici sunt bacili nesporulați, Gram negativi, cu dimensiuni medii de 1,5–2 / 0,3–0,4 μm, cu capete rotunjite sau uşor aplatizate, monotrihi (fig. 266). Lungimea flagelului terminal polar depăşeşte de 4-5 ori lungimea celulei.

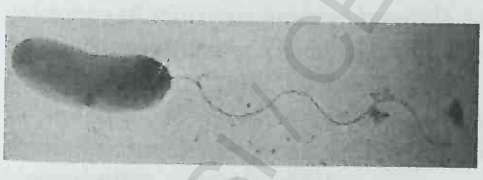


Fig. 266. Imagine la microscopul electronic, metoda colorației negative, a vibrionului holeric. Se observă flagelul polar. (http://www.tjclarkinc.com/bacterial_diseases/cholera_vibrio_cholerae.htm).

Vibrionii holerici se dezvoltă cu uşurință pe medii simple (apa peptonată, bulion, agar nutritiv, gelatină). În medii lichide tulbură uniform mediul, cu creştere redusă după 6–8 ore la 37°C şi intensă după 18–29 ore; uneori se poate forma un depozit pe seama peliculei formate la suprafața mediului; capacitatea de a se dezvolta la suprafață, cu sau fără peliculă, la pH alcalin (9,2), mai rapid decât alte bacterii aerobe ale microbiotei intestinale, a permis selectarea apei peptonate alcaline ca mediu de îmbogățire. Sunt sensibili la acțiunea pH mai mic de 6,4 (în mediile ce conțin zaharuri fermentabile, prin păstrarea îndelungată a culturii, se produce „autosterilizarea"). Pe agar nutritiv (18–20 ore la 37°C) creşte sub formă de colonii rotunde cu suprafața uşor bombată, convexă, margini regulate, translucide, fără iridescență la examenul în lumina oblică (10–12 ore) şi opace după 18–20 ore la 37°C. Lichefiază gelatina (48 ore), tardiv (7 zile) şi mediul cu ser de bou. Se dezvoltă în prezența

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

sărurilor biliare, sulfitului, teluritului de potasiu, substanțe utilizate în mediile uzuale selective, în scopul izolării. Prezența fierului în mediul de cultură (culturi submerse) favorizează creşterea, contribuind şi la creşterea virulenței bacteriene. În mediile de cultură cu conținut redus de fier, vibrionul holeric produce siderofori.

Dintre antigenele celulei vibrionice, un rol esențial în stimularea răspunsului imun îl au constituenții flagelului (proteina antigenică H, lb. germană *hauch* = văl) şi ai peretelui celular (lipopolizaharidul = antigenul O = endotoxina bacteriilor Gram negative). Determinanții chimici ai antigenității H sunt insuficient cunoscuți, spre deosebire de cei ai antigenității O, a căror structură a fost corelată cu diversele funcții imunologice şi toxice ale lipopolizaharidului (LPS). Ca şi în cazul altor endotoxine, LPS vibrionului holeric are potențial mitogen (imunomodulator), cu activitate stimulatoare pentru macrofage, activatoare policlonală a celulelor B şi endotoxică prin lipidul A. Recent s-a recunoscut şi capacitatea imunogenă a lipidului A (inductor al sintezei anticorpilor aparținând claselor IgM şi IgG), toate regiunile LPS fiind antigenice. După infecție, organismul este protejat prin sIgA din secreția mucoasei intestinale.

Factorii de virulență

Toxina holerică

Cu mai bine de un secol în urmă, Robert Koch (1883–1885) prezenta dovezi clare care incriminau ca agent etiologic al holerei, vibrionul (*Comma bacillus),* sugerând prezența unei toxine care se absoarbe parțial şi acționează în special asupra aparatului cardiovascular.

Toxina holerică *(„Choleragen"* sau *holotoxina holerică)* este o enterotoxină reprezentată de o moleculă proteică mare (gr. mol. 82 kDa), alcătuită din trei subunități notate A1, A2 şi B. *Subunitatea A*, complexă, este sintetizată ca o catenă polipeptidică unică, clivată în celulele producătoare, sub acțiunea proteazelor în alte două subunități: A1 şi A2. *Subunitatea A1* reprezintă componenta biologic activă, purtătoare a funcției toxice, care este slab imunogenă. Are funcția ADP-ribozilantă a unui component al sistemului adenilat ciclazei. Separată de restul moleculei, are un efect nesemnificativ asupra celulelor întregi. *Subunitatea A2* (gr. mol. 5 kDa) este legată de A1 printr-o legătură disulfidică (-S-S-). Poate fi separată cu solvenți de disociere (detergenți, guanidină hidroclorică 6M). Inițial, s-a considerat ca având rolul unic de stabilizare a complexului A. Apoi s-a demonstrat ca A2 este necesară şi pentru translocația toxinei în celulă, deoarece poartă o secvență „semnal", implicată în transferul transmembranar.

Subunitatea B („Choleragenoid" sau *„Toxoid H",* gr. mol. 56 kDa), este lipsită de activitate toxică, dar, în schimb, are activitate antigenică (toxoid). Este alcătuită din *cinci subunități identice*. Modul de grupare a subunităților este puțin cunoscut. Are funcția de legare a toxinei de membrana celulară.

Sinteza toxinei holerice este controlată şi reglată de genele *tox* cromosomale (sau *ctx*), Subunitățile A şi B ar fi sintetizate separat în citoplasmă pe polisomi liberi. Asamblarea lor într-o moleculă unică se face în spațiul periplasmic, de unde sunt eliberate foarte eficient în mediul înconjurător.

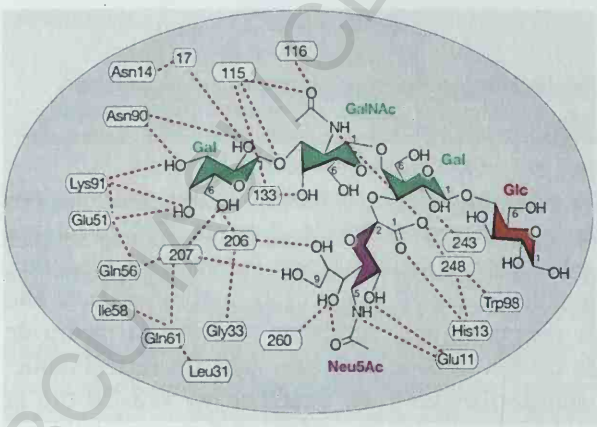


Fig. 267. Structura simplificată a gangliozidului GM1 şi prezentarea situsurilor de legare a toxinei holerice prin diferiți aminoacizi ai subunității B (după Cummings şi Esko, 2009).

b) *Pătrunderea enterotoxinei în enterocit.* Toxina se fixează la receptorii specifici din platoul striat al enterocitului, reprezentați de monosialogangliozidul – GM1.

Gangliozidele sunt molecule lipidice complexe prezente în toate membranele plasmatice studiate. Ele au o porțiune hidrofilă, încărcată electronegativ, care conține resturi de D-galactoză, D-glucoză, N-acetil galactozamină şi acid N-acetil neuraminic, precum şi o porțiune lungă hidrofobă – *ceramida* – care conține acizi graşi cu lanț lung asociați cu *sfingozina.* Unul dintre cele mai cunoscute gangliozide este GM1 (galactozil-N-acetil-galactozaminil-sialozil-lactozil-ceramida), prezent în cantitate mare şi în țesutul cerebral (fig. 267). Datorită

acestei particularități structurale, ceramida se poate insera în faza fluidă a membranei celulare, lăsând porțiunea glucidică a moleculei pe fața externă a membranei, pentru a acționa ca receptor pentru toxina holerică.

Capacitatea gangliozidelor, în general, și a GM1 în special, de a lega toxina holerică și corelația strânsă dintre cantitatea de gangliozide și cea de toxină legată, demonstrate experimental, sunt dovada faptului că gangliozidele sunt receptorii naturali pentru toxina holerică.

În plus, toxina legată de gangliozide este inactivă și nu se mai poate lega de alte celule. Numărul receptorilor gangliozidici de toxină holerică este variabil, în funcție de natura celulelor. Numărul moleculelor de toxină holerică necesare pentru producerea unor modificări morfologice este de 10/celulă, iar pentru efectul toxic de 50/celulă. Discrepanța dintre numărul relativ mare de receptori și concentrația de toxină necesară pentru a produce efecte biologice evidente reflectă fie ineficiența procesului de înglobare a toxinei, fie existența a două tipuri de receptori (eficienți și ineficienți).

S-au descris două mecanisme de pătrundere a toxinei în celule:

1) *Mecanismul principal* de înglobare este reprezentat de endocitoza mediată de receptori. După Sahyoun și Cuatrecasas (1975), inițial o singură subunitate B s-ar lega de gangliozide. Ulterior ar avea loc o difuzie laterală în planul membranei celulare, până când toate cele cinci subunități ale toxinei s-ar asocia cu cinci molecule de gangliozide. Deplasarea laterală a complexelor toxină/GM1 este demonstrată de cel puțin două fenomene: 1) stoparea deplasării complexului în prezența anticorpilor specifici și blocarea efectului toxic; 2) în intestin, toxina holerică se leagă de bordura în perie a celulelor mucoasei. Ori, adenilat ciclaza este localizată exclusiv pe suprafețele laterale și bazală a celulelor. Deci, pentru a-și exercita efectul, toxina, după ce s-a legat în regiunea apicală a celulelor intestinale, trebuie să se deplaseze pe suprafața celulei, spre zona latero-bazală. În cursul deplasării complexului toxină/receptor, în planul membranei s-ar realiza o redistribuire a receptorilor, cu formarea de „petice" („*patch*") și „bonete" („*capping*"). Bonetarea ar favoriza asocierea complexului toxină/receptor cu o proteină membranară integrată, care ar favoriza translocația complexului în celulă.

2) *Al doilea mecanism* posibil de încorporare a toxinei holerice se bazează pe unele dovezi experimentale, care demonstrează apariția unor alterări conformaționale ale toxinei, după legarea la receptori. Legarea subunității B ar induce modificări de permeabilitate a membranei și în plus „inelul" B s-ar deplia, favorizând formarea unui „canal" în structura acesteia.

Subunitatea A, eliberată de constrângerile impuse de restul subunităților proteice cu care a fost asociată, poate interacționa și traversa membrana lipidică.

Eliberarea segmentului activ A1 în celulă se face prin clivarea legăturilor S-S. Agentul reducător natural este glutationul, ceea ce explică faptul că legăturile S-S se mențin rareori în mediul intracelular.

c) *Mecanismul de acțiune.* Toxina holerică acționează producând ADP-ribozilarea subunității reglatoare a sistemului adenilat ciclazei.

Adenilat ciclaza este o enzimă multisubunitară, localizată pe fața internă a membranelor celulare, având componentul catalitic în contact cu citosolul. Ea poate exista sub formă activă sau inactivă, datorită unui component reglator cunoscut sub denumiri diferite: proteina G, proteina G/F sau proteina Ns a ciclazei, și care are un situs de legare pentru GTP. În stare activă, adenilat ciclaza are un rol esențial în modularea concentrației AMPc, cu efecte directe asupra metabolismului celular, după reacția: ATP ↔ AMPc + PPi.

În absența activatorului ciclazei, concentrația AMPc revine rapid la normal, datorită enzimei AMPc-fosfodiesteraza, prezentă permanent în celule. Ea are rolul de a hidroliza AMPc la AMP (fig. 268). În felul acesta, concentrația AMPc în celule este, în orice moment, rezultatul a două efecte opuse: al adenilat ciclazei și al fosfodiesterazei.

Totodată, Kieffer și colab. (1975) au demonstrat că toxina holerică ar inhiba guanilat ciclaza și ar scădea concentrația GMPc în celulă. S-ar realiza astfel,

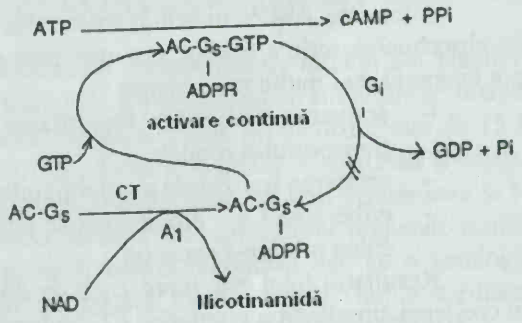


Fig. 268. Reprezentarea schematică a reacțiilor implicate în calea adenilat ciclazei.

un dezechilibru al celor doi produşi cu importanţă fundamentală pentru celulă, AMPc şi GMPc, a căror concentraţie, după cum se ştie, oscilează în sens opus: când unul creşte, celălalt scade.

Sintetizând aspectele moleculare ale acestui proces, reiese următoarea schemă de evoluţie: complexul proteină G/GTP interacţionează cu componentul catalitic al ciclazei, pentru a forma un sistem activ în sinteza AMPc din ATP. Hidroliza GTP la GDP converteşte proteina de reglare G la o formă care nu mai activează unitatea catalitică. Pentru a reactiva sistemul enzimatic, are loc disocierea complexului proteină G/GDP, urmată de legarea, din nou, a GTP de situsul originar.

Funcţional, ADP-ribozilarea proteinei de reglare G de către toxina holerică (subunitatea A1), converteşte această proteină la o stare incapabilă să producă hidroliza GTP. Ori, inhibarea activităţii GTP-azei determină o activare persistentă a componentei catalitice a ciclazei. Rezultatul final este creşterea concentraţiei AMPc în celulă (fig. 269).

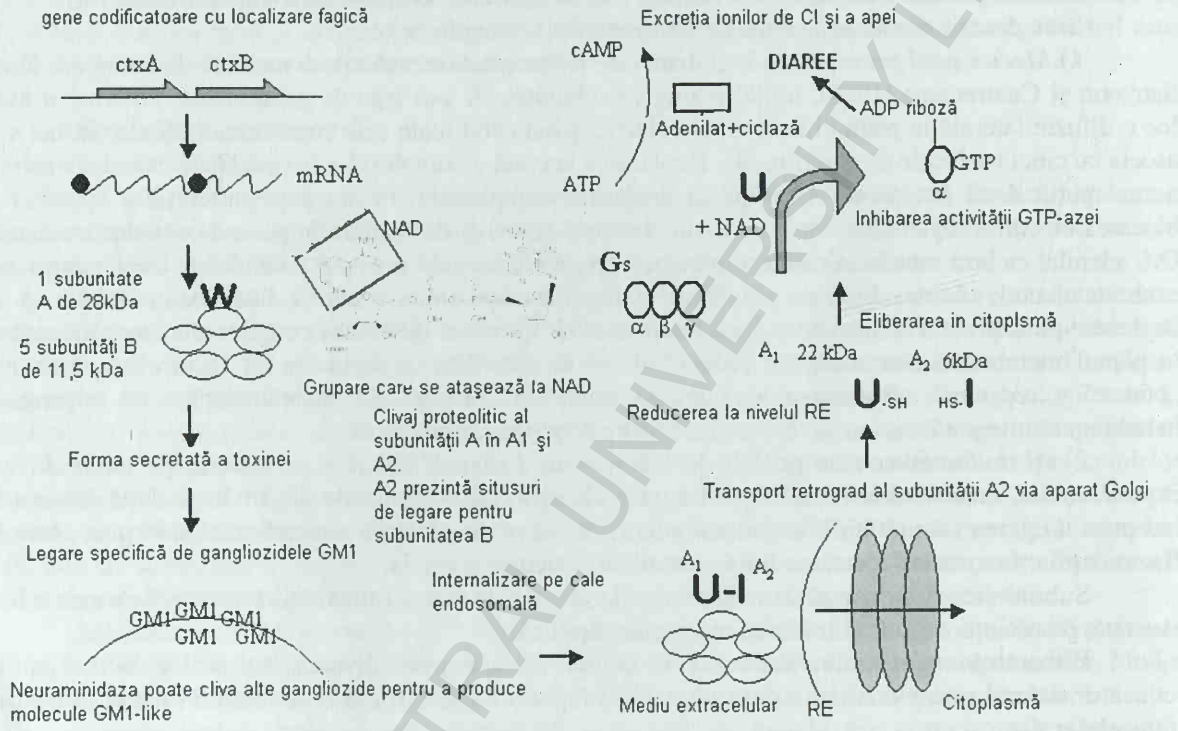


Fig. 269. Ilustrarea schematică a mecanismului de acţiune a toxinei holerice (după Primm, 2002).

d) *Consecinţele creşterii AMPc în celule.* În mod obişnuit, celulele mucoasei intestinale au un potenţial electric transmembranar cu o valoare mică, ceea ce explică schimburile echilibrate, datorate permeabilităţii pasive accentuate a mucoasei, ce asigură fluxul unidirecţional de Na^+ şi Cl^- din lumen spre circulaţia sanguină. Acesta este compensat de un flux moderat în direcţie opusă, cu deplasarea spre lumen, în special a ionului bicarbonat.

Creşterea AMPc în celule are o serie de efecte profunde, deoarece perturbă procesele normale de absorbţie/secreţie a ionilor şi a apei prin epiteliul intestinal. Pentru realizarea acestui dezechilibru pot interveni mai multe mecanisme:

- activarea enzimelor fosforilante de tipul protein-kinazelor, cu acţiune directă asupra transportului ionilor;
- creşterea tranzitorie a potenţialului electric membranar;
- eliberarea Ca^{2+} din depozitele celulare şi acţiunea acestora asupra purtătorilor de ioni, pe calea protein-kinazelor.

Rezultatul final este reprezentat de *diminuarea absorbţiei* Na^+ în celulele microvililor asociată cu creşterea simultană a *eliminării* Cl^-, reducerea absorbţiei Na^+ şi Cl^- şi un eflux masiv de apă. Astfel se explică particularitatea clinică majoră a *enteritei acute*, cu pierdere masivă de lichide, deshidratare gravă şi şoc consecutiv.

BCU "CAROL I" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Un factor favorizant îl constituie mobilitatea agentului patogen, care îi permite să pătrundă prin mucusul intestinal în criptele microvilozităților, să se lege de bordura în perie a enterocitelor. Probabil că un rol important în aderența la mucoasa intestinului subțire îl au fimbriile și flagelii, structuri ce ancorează celulele bacteriene la epiteliul mucoasei. Astfel, celulele bacteriene rezistă la eliminare prin fluxul conținutului intestinal și peristaltism.

Toxinele accesorii. Unele tulpini de *V. cholerae* O:1, cu mutații specifice în regiunea *ctx*, sunt capabile să producă boala diareică, prin secreția unei toxine care mărește permeabilitatea mucoasei intestinului subțire, acționând asupra structurii joncțiunilor intercelulare, *toxina zonula occludens* (ZOT), denumită astfel după situsul de acțiune.

O altă toxină, *toxina holerică accesorie* (ACE), a fost identificată de Trucksis și colab. (1993). Genele *zot* și *ace* sunt localizate în *„caseta de virulență"* (regiune genomică mobilă, datorită secvențelor repetate invers localizate la ambele capete, sau la o singură extremitate), alături de genele *ctx*.

Circa 60% din totalul infecțiilor cu *V. cholerae* biotip clasic sunt asimptomatice. Dacă infecția se face cu alimente contaminate, sunt necesare 10^2–10^4 celule. Pentru persoanele cu aciditate gastrică optimă, sunt necesare 10^{10} celule ingerate, pentru că *V. cholerae* este sensibilă la pH acid.

Pentru cazurile cu evoluție clinică, incubația este de 1–4 zile, în funcție de numărul celulelor bacteriene ingerate. Starea de rău general se instalează brusc, cu vomă, dureri abdominale și diaree profundă. Scaunele au aspectul tipic de "apă cu orez" și conțin celule epiteliale, număr mare de vibrioni. Fluidul și electroliții se pierd rapid, rezultatul fiind deshidratarea profundă, colapsul circulator, anuria. În absența tratamentului, mortalitatea poate atinge 50%.

Rezervorul natural al *V. cholerae* este apa. Bacteria trăiește atașată de alge, de crustacee, unde poate supraviețui în stare de latență, pe perioade de ordinul anilor, reluîndu-și creșterea în condiții adecvate.

Pentru *diagnostic*, probele de apă sau de scaun diareic se însămânțează direct sau după îmbogățire în apă peptonată alcalină (pH 9.6) (timp de 6–24 ore) pe medii selective (BSA – *Bile Salts Agar*) sau înalt selective (TCBS) (*Thiosulphate – Citrate – Bile Salts – Sucrose*). *V. cholerae* formează colonii cu aspect caracteristic (colonii în picătură de rouă pe BSA, respectiv, colonii galbene, lactozo-pozitive pe TCBS). Din coloniile dezvoltate pe BSA se realizează aglutinarea cu ser anti O:1 și anti O:139, reacția oxidazei și identificarea biochimică.

V. mimicus este considerat în scara filogenetică ca o verigă între *V. cholerae* și vibrionii halofili, este varianta zaharoză-negativă a speciei *V. cholerae*. Cei doi vibrioni au fenotipuri și genotipuri similare. Unele tulpini sintetizează CT (fără a produce însă infecții epidemice), alte tulpini produc toxina TDH și toxina termostabilă. *V. mimicus* produce diaree și infecții auriculare.

Vibrio parahaemolyticus este un microorganism halofil, estuarin, descoperit în 1950 în Japonia unde a provocat prima epidemie. Deși nu toate tulpinile sunt patogene, *V. parahaemolyticus* este cauza majoră de gastroenterită în țările unde se consumă fructe de mare crude (creveți, crabi, homari) (Yeung și Boor, 2004). Prevalența infecțiilor cu această bacterie este în relație directă cu creșterea temperaturii apei. Temperatura, salinitatea, zooplanctonul, fluxul/refluxul și cantitatea de oxigen dizolvat în apă joacă un rol important în distribuția spațială și temporală a acestei specii (Nair *et al.*, 2007). Tulpinile patogene se grupează în cel puțin 13 serogrupuri determinate de antigenele O și K. *V. parahaemolyticus* O3:K6 are caracter pandemic.

Vibio parahaemolyticus produce trei tipuri de sindroame: gastroenterită, infecții ale plăgilor, septicemie. (Burdette și colab., 2009). Cel mai comun sindrom este gastroenterita cu simptomele: diaree, crampe abdominale, amețeală, vomă, dureri de cap și febră. Perioada medie de incubare este de 15 h (între 4–96 h). Boala este autolimitantă și moderată ca severitate, durează în medie 3 zile (Nair și colab., 2007). Fructele de mare, care în general se hrănesc prin filtrare, concentrează bacterii printre care și *V. parahaemolyticus,* care poate produce infecții prin consumul de alimente insuficient preparate termic (Yeung și Boor, 2004). Infecția poate fi fatală pentru pacienți imunocompomiși sau cu o patologie preexistentă precum bolile hepatice, diabetul, pacienții neoplazici, bolile renale, bolile cardiace, intervențiile gastrice recente, utilizatorii de medicamente antiacide gastrice (Yeung și Boor, 2004).

Există două biotipuri distincte de *Vibrio parahaemolyticus*, evidențiate prin cultivarea microorganismului pe agar Wagatsuma. Acest tip de agar conține hematii umane sau provenite de la

iepure. Un biotip produce liza hematiilor fiind pozitiv pentru fenomenul Kanagawa (KPP), iar celălalt este negativ pentru fenomenul Kanagawa (KPN) (Bates şi Oliver, 2004). Fenomenul Kanagawa a fost observat la 80–90% din tulpinile clinice şi doar la 1–2% din tulpinile izolate din natură. Cauza hemolizei evidenţiate pe agarul Wagatsuma este producerea hemolizinei termostabile directe (*thermostable direct hemolysin*-TDH). Activitatea TDH constă în liza eritocitelor de la mai multe specii, citotoxicitate, toxicitate letală pentru animale mici de laborator, stimularea acumulării de lichid în ansa ileală de iepure.

Tulpinile izolate de la pacienţi cu gastroenterită prezintă fie TDH, fie o hemolizină înrudită, TRH (*thermostable direct hemolysin related hemolysin*) sau în unele cazuri ambele proteine.
Funcţia hemolitică are la bază proprietatea de toxină formatoare de pori a TDH ce induce o liză coloidală osmotică a hematiilor provenite de la diverse specii de mamifere (Fabri *et al.*, 1999).

Printre factorii de virulenţă ai *V. parahaemolyticus* se numără şi două sisteme de secreţie de tip 3 (T3SS). Recent, s-a demonstrat că T3SS1 induce moartea celulară rapidă a celulelor eucariote ce se iniţiază cu autofagia. Autofagia este procesul prin care celulele degradează proteinele vechi şi îşi înlocuiesc organitele afectate prin proteoliză lizosomală.

Vibrio alginolyticus este o specie halofilă care rezistă la concentraţii de NaCl de 1–12 g%. Trăieşte în apele marine, costale, estuarine şi pe fauna acestora (scoici, peşti, crabi, creveţi). Este mult mai puţin sensibil la variaţiile de temperatură din mediul extern, fiind prezent în mediul marin pe tot parcursul anului. A fost izolat ocazional şi din intestinul omului sănătos. Determină enterite acute fără diaree şi infecţii extraenterice: infecţii ale ţesuturilor moi, otite, infecţii oculare, ale plăgilor arse, infectate prin contactul cu apa marină, pneumonii de aspiraţie (la înnecaţi resuscitaţi). Pentru acest vibrion, este caracteristic fenomenul de invazie (ca şi la *Proteus*) după însămânţare pe mediu neselectiv.

Vibrio vulnificus rezistă la concentraţii de NaCl de 1–6 %. Se găseşte pe flora marină normală şi în regiunile costale (estuarine). Majoritatea cazurilor de infecţie apar în lunile calde (mai-octombrie) pe coastele marine unde se consumă fructe de mare crude. 50–60% din infecţiile umane sunt fatale. Acest vibrion are mare capacitate de invazie producând infecţia cea mai severă dintre toate speciile de vibrioni, cu tablou septicemic, consecutiv ingerării de fructe de mare (stridii contaminate). În absenţa oricăror simptome enterale, după o săptămână de la ingerarea alimentelor contaminate sau de la contaminarea plăgilor (infectarea ulcerelor trofice ale gambelor). apar semnele de infecţie septicemică (febră, stare de prostraţie etc.). În cazul leziunilor pielii suprainfectate, apar manifestări dermo-epidermice buloase cu necroza dermului de la nivelul căruia vibrionii diseminează pe cale hematogenă producând septicemie fulminantă cu evoluţie fatală. În aceste cazuri lipseşte total răspunsul de tip inflamator, dar apar leziuni de tipul vasculitei necrozante a ţesutului subcutanat. Starea de *sepsis* fulminantă pare că se datorează unei toxine RTX formatoare de pori, cu acţiune hemolitică ce determină necroza celulară. *V. vulnificus* poate produce infecţii auriculare, pneumonii de aspiraţie (la înnecaţi resuscitaţi), meningite, infecţii conjunctivale, corneene. Au fost raportate şi cazuri de miozita bacteriană în care nu s-a putut pune în evidenţă poarta de intrare cutanată. Studiile din ultimii ani au descris la tulpinile de *V. vulnificus* două genotipuri: C, prezent la 90% din tulpinile de origine clinică, şi E, prezent la 93% din tulpini izolate din mediul extern. S-a demonstrat că cele două genotipuri prezintă proprietăţi identice (rată de creştere, capacitate de supravieţuire la diferite concentraţii de NaCl şi la diferite temperaturi, sensibilitate la hemolimfa scoicilor, mobilitate, răspuns la stresul oxidativ), singura diferenţă fiind rezistenţa mai mare la acţiunea bactericidă a serului uman pentru tulpinile de genotip uman C datorită prezenţei unui siderofor.

V. damsela a fost izolat din apele Oceanului Pacific, fiind implicat în infecţiile plăgilor expuse la apa marină.

V. charcariae este specia descrisă recent de vibrioni halofili, care la om produce infecţii extraenterale (a fost izolat din plăgi suprainfectate consecutiv muşcăturii de rechin).

V. cincinnatiensis a fost izolat ocazional din sânge şi lichid cefalorahidian la pacienţi cu infecţii generalizate.

V. hollisae a fost izolat ocazional din cazuri de diaree.

Grupul F (sau grupul CDC EF6) ocupă o poziţie intermediară între genul *Vibrio* şi *Aeromonas*, necesitând pentru dezvoltare o concentraţie de NaCl de 1–7% şi chiar 10%. Cuprinde

speciile *V. fluvialis* şi *V. furnisii.* Habitatul natural este reprezentat de zonele estuarine, sedimente marine şi ape menajere.

V. fluvialis este un patogen emergent care produce boală diareică acută, atât cazuri sporadice, cât şi focare de diaree tip holeriform (cu dureri abdominale, vomă, scaune apoase, deshidratare masivă) sau diaree muco-sanguinolentă.

V. furnisii are ca habitat natural zonele estuarine, apele râurilor şi peştii. Poate declanşa epidemii de boală diareică la om şi animale (la porcii hrăniţi cu concentrate din praf de peşte).

V. anguillarum colonizează ţesutul cutanat al broaştelor ţestoase şi a peştilor, iar în 5–24 ore formează deja biofilme, de la nivelul cărora traversează bariera cutaneomucoasă producând septicemie hemoragică fatală la peştii marini.

V. metschnikovii este singurul vibrion oxidazo-negativ şi a fost izolat din ape de suprafaţă (râuri, estuare), ape de canal fecaloid menajere, fructe de mare, unele specii de crustacee, din intestinul omului şi animalelor. Nu este considerat în mod cert ca agent patogen. Este interesant că acest vibrion, în comparaţie cu toţi ceilalţi, are reactivitate total inversă la variaţiile de temperatură, fiind prezent în cochiliile crustaceelor numai în perioada rece a anului. De la om a fost izolat din cazuri de septicemie şi de colecistită.

12.1.2. Genul *Aeromonas*

După Bergey (ed. 1984) genul *Aeromonas* cuprinde două grupe separate: i) aeromonade pshichrofile imobile reunite sub denumirea de *Aeromonas salmonicida,* patogenă la peşti; ii) aeromonade mezofile mobile divizate în trei specii: *A. hydrophila, A. caviae* şi *A. sobria,* implicate în patologia umană, deşi analizele de hibridizare ADN au permis stabilirea a 12 genomospecii.

A.hydrophila reuneşte bacili Gram negativi, mobili (flagel monotrih dispus polar), drepţi sau foarte rar curbaţi, dispuşi în pereche sau lanţuri, pleomorfi (de la forme cocoidde până la forme filamentoase), facultativ anaerobi, de obicei necapsulaţi, rezidenţi ai microbiotei acvatice, cu o distribuţie practic cosmopolită în medii umede cu substanţe organice, având un optimum de creştere la 22–37°C, deşi se pot dezvolta şi la temperaturi cuprinse între 0°C şi 45°C. Prezintă toleranţă pentru NaCl, între 0 şi 4%.

A. hydrophila se dezvoltă cu uşurinţă pe medii uzuale de cultură, pe care formează colonii asemănătoare enterobacteriilor. Pe mediile de izolare folosite în diagnosticul *Enterobacteriaceaelor,* dezvoltă colonii lactozo-negative sau pozitive, asemănătoare cu *E. coli.* Pe geloză-sânge pot produce uneori β-hemoliză, caracter asociat cu virulenţa. Unele tulpini produc dublă hemoliză: o zonă externă de hemoliză incompletă şi una internă, completă, de β-hemoliză (Buiuc şi Neguţ, 2002).

Ca agent selectiv se utilizează ampicilina (5 μg/ml) (mediu Havellar) (fig. 270).

A. salmonicida cultivat pe agar nutritiv, incubat la 22°C timp de 48 ore formează colonii rotunde şi transparente, iar pe medii cu 1% tirozină formează un pigment brun hidrosolubil. Coloniile de *A. caviae* sunt nehemolitice.

Sunt oxidazo-pozitivi, catalazo-pozitivi. *A. hydrophila* este divizat în 2 biotipuri: I – produce gaz prin fermentarea glucozei; II – fermentează glucoza fără producere de gaz. Fermentează fructoza, maltoza, trehaloza şi uneori lactoza, hidrolizează amidonul, dextrina, cazeina şi glicerolul, nu fermentează adonita, inozina, xiloza şi melizitoza. Reduc nitraţii la nitriţi, lichefiază gelatina, sintetizează o dezoxiribonuclează, lipaze, lecitinaze, fosfatază şi în general arginin-dihidrolază; unele tulpini sunt VP pozitive, deci produc acetoina din glucoza.

A. hydrophila este rezistent la acţiunea agentului vibriostatic „0"/129 (2,4-diamino 6,7 diisopropilpteridină) chiar la o concentraţie de 400 μg /disc.

A. hydrophila este sensibil la acţiunea factorilor fizici şi chimici, fiind

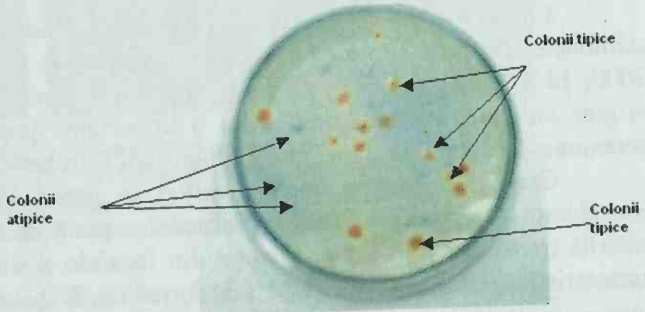


Fig. 270. Aspectul coloniilor de *Aeromonas* pe mediu selectiv Havelaar.

distrus instantaneu prin fierbere şi în câteva minute sub acţiunea radiaţiilor ultraviolete, a sublimatului şi a fenolului 1%.

Prezintă sensibilitate moderată la streptomicină şi eritromicină şi sunt rezistenţi la ampicilină, carbenicilină, penicilină, oxacilină şi meticilină.

Un procent foarte mare din tulpinile de *Aeromonas* sunt producătoare de β-lactamaze sensibile sau rezistente la inhibitori.

Aeromonadele sunt implicate atât în infecţii intestinale (mai ales gastroenterite), cât şi extraintestinale (infecţii ale ţesuturilor moi – tonsilite, infecţii de plagă, meningite, bronhopneumonii, peritonite, septicemii, ulcere corneene etc) (Janda, 1988, 1991).

Virulenţa genului *Aeromonas* este multifactorială. Principalul factor de virulenţă este β-hemolizina citotoxică sau citolitică sau aerolizina produsă de *A. hydrophila, A. sobria, A. caviae* şi *A. trota.* Aerolizinele sunt toxine formatoare de pori care produc acumulare de lichid în ansa ileală de iepure probabil prin stimularea producerii de AMPc, au efect letal la şoarece şi exercită efect citotoxic asupra diferitelor celule eucariote.

Aerolizina stimulează apoptoza celulară, producerea factorului tumoral α şi a altor citokine proinflamatorii, precum şi activarea metabolismului acidului arahidonic în macrofage.

O altă β-hemolizină produsă de *Aeromonas* este hemolizina *Hly A*, care are 45–51% omologie a aminoacizilor cu toxina holerică şi cu toxina Shiga *like* 1. Au fost descrise şi alte enterotoxine citotonice, care nu sunt hemolitice şi determină alungirea celulelor CHO (*C*hinese *H*amster *O*vary), ca şi producerea de AMP ciclic (e.g. proteina termostabilă de 15–20 kDa, proteina termolabilă de 44 kDa şi proteina *Ast* de 71 kDa).

Aeromonadele secretă o varietate de enzime şi molecule (metaloproteaze, serinproteaze, DN-aze, lipaze, lecitinaze, colesterol acetil- transferaza, enolaza, siderofori) al căror rol în patologia umană nu a fost încă demonstrat. Aderenţa la celulele epiteliului intestinal este un factor de virulenţă esenţial pentru patologia infecţiilor enterice. Structurile filamentoase implicate în aderenţă includ pilii flexibili *Bfp* şi flagelii laterali şi polari. Unele tulpini de *A. hydrophila, A sobria* şi *A. caviae* invadează celulele HEp-2, celulele intestinale CaCo-2 şi linia celulară Henle 407.

12.1.3. Genul *Photobacterium*

V. fischeri se găseşte în mediul marin atât în zonele temperate, cât şi în cele subtropicale ca simplu saprobiont sau asociat în interacţiuni cooperative (organele luminoase ale unor specii de peşti sau moluşte) sau patogene pentru animalele gazdă.

V. harveyi este un patogen semnificativ al vertebratelor marine, dar apare ocazional şi în infecţii la om. La peşti produce ulceraţii, leziuni oculare, gastroenterite. La scoici determină o vibrioză luminoasă (stralucirea în întuneric). La om produce infecţii ale plăgilor după muşcătura de rechin. Patogenitatea sa se datorează adezinelor, proteazelor, hemolizinelor, LPS şi sideroforilor.

12.2. Spirili

12.2.1. Campylobacterii

Campylobacteriile (lb. greacă *kampylos* + *bakteria* = bacil curbat) sunt considerate, alături de salmonele, cei mai importanţi agenţi etiologici ai gastroenteritelor bacteriene la om (FAO/WHO, 2009; EFSA, 2010). Campylobacteriozele sunt zoonoze care au ca principală sursă alimentele de origine animală, reprezentând astfel o importantă problemă de sănătate publică, cu impact socio-economic deosebit, atât la nivelul Comunităţii Europene, cât şi pe plan mondial.

Campylobacteriile, incluse iniţial în genul *Vibrio* (numite anterior *Vibrio fetus*) au fost considerate patogeni exclusivi ai animalelor până în 1938, când Levy, în cursul unei epidemii de enterită transmisă prin lapte, a izolat din fecalele şi din sângele bolnavilor bacteriile cu morfologie caracteristică (bacili subţiri, curbaţi, în formă de "S").

În 1973 Véron şi Chatelain au inclus în genul *Campylobacter* speciile *C. fetus, C. jejuni* şi *C. coli* (Moore şi colab., 2005; Euzeby, 2010). În prezent, genul cuprinde 22 specii, cu 10 subspecii şi

3 biovariante, încadrate în 3 grupe: grupa termofililor, grupa „fetus" şi grupa anaerobilor. Toate speciile se dezvoltă la 37°C, dar *C. jejuni, C. coli, C. lari* şi *C. uppsaliensis* sunt catalogate ca specii termofile datorită dezvoltării optime a majorităţii tulpinilor la 41–43°C. *C. jejuni* şi *C. coli* sunt considerate cele mai importante specii pentru sănătatea publică, implicaţia celorlalte fiind mai redusă. *C. jejuni* subsp. *jejuni* este agentul etiologic principal al enteritelor acute, iar *C. jejuni* subsp. *doylei* nu este termofilă şi a fost izolată doar de la copii cu sindrom diareic din ţările dezvoltate. În general, când se utilizează doar denumirea de *C. jejuni,* se face referire la subsp. *jejuni.*

Bacteriile din genul *Campylobacter* se caracterizează prin polimorfism morfologic. Sunt bacili Gram negativi nesporulaţi, curbaţi, în formă de S, virgulă, pescăruş în zbor sau spiralaţi, cu diametrul 0,2–0,8 μm şi lungimea 0,5–8 μm. În cazurile în care celulele nu se separă după diviziune, se pot observa şi forme spiralate foarte lungi. Majoritatea speciilor genului sunt mobile, mono- sau amfitriche, cu mişcări rapide caracteristice, de tirbuşon. Există şi excepţii: *C. hominis* se prezintă sub formă de bacili drepţi, imobili iar *C. gracilis* este o specie imobilă.

În condiţii de stres şi în culturile învechite s-a remarcat transformarea formelor spiralate în forme cocoide, care de fapt permit campylobacteriilor supravieţuirea la variaţiile condiţiilor de mediu. Există posibilitatea ca formele cocoide să-şi piardă capacitatea de a fi subcultivate pe medii de cultură şi să se transforme în forme viabile dar necultivabile (*viable but non culturable* – VBNC), viabilitatea putând fi redobândită prin pasaje pe animale sau protozoare.

Heterogenitatea morfologică şi fiziologică a celulelor bacteriene aparţinând speciilor din genul *Campylobacter,* în relaţie cu condiţiile de mediu, poate fi surprinsă chiar în interiorul unei colonii dezvoltate pe suprafaţa unui mediu solid. La periferia coloniei celulele bacteriene sunt active metabolic, în timp ce în centrul şi la suprafaţa coloniei, unde nutrienţii s-au epuizat, bacteriile sunt îmbătrânite şi inactive. Astfel, la examinarea prin metoda SEM s-au observat diferite aspecte morfologice ale bacteriilor, în funcţie de localizarea lor în colonie, cu predominanţa formelor spiralate la periferie şi a formelor cocoide în centrul clonei, ceea ce sugerează că bacteriile spiralate sunt formele active, iar cele cocoide sunt formele inactive. Trecerea de la formele spiralate la cele cocoide se realizează printr-o formă intermediară, cu aspect de „gogoaşă", al cărei mecanism de formare este neclar (fig. 271).

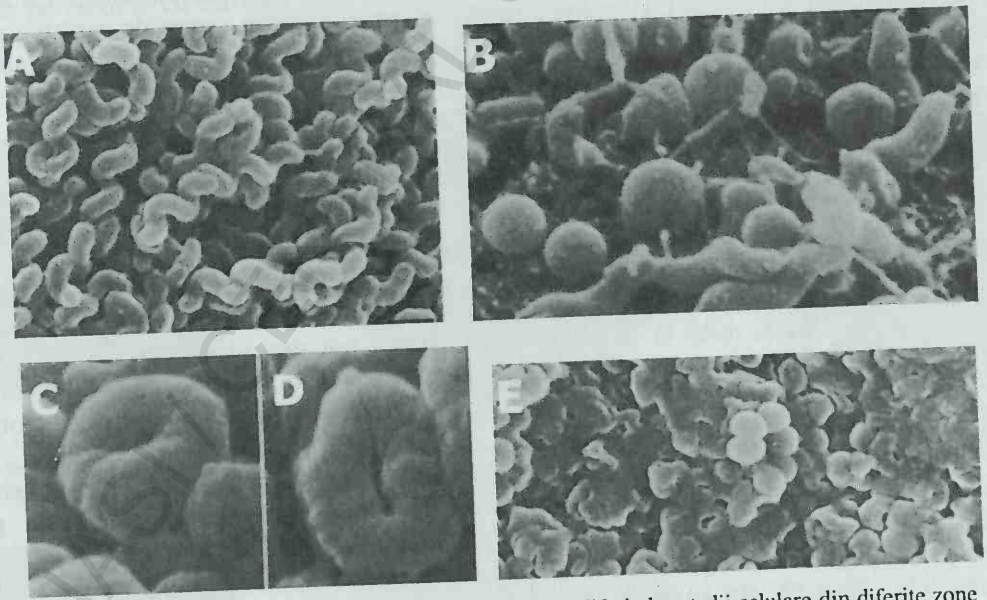


Fig. 271. Imagine electrono-optică de scanning (SEM) a diferitelor stadii celulare din diferite zone ale unei colonii de *C. jejuni,* 72 h incubaţie la 37°C: (A) forme spiralate de la periferia coloniei, (B) forme predominant cocoide şi spiralate de la suprafaţa coloniei, (C) şi (D) detaliu al aspectului de „gogoaşă", (E) forme cocoide şi material amorf din centrul coloniei (Ng, Sherburne et al. 1985).

Campylobacteriile sunt oxidază şi catalază pozitive, produc H_2S, hidrolizează indoxil acetatul şi hipuratul de sodiu, nu fermentează glucidele, energia fiind obţinută din aminoacizi sau din produşi intermediari ai ciclului Krebs. Nu hidrolizează gelatina, ureea, sunt lipsite de lipază, triptofanază.

În funcție de specie, dezvoltarea campylobacteriilor necesită temperaturi de 25–43°C, pH 7.2–7.4, concentrații de 3–15% O_2, 8–10% CO_2, aminoacizi (obligatoriu acid glutamic, acid aspartic şi cistină), vitamine (niacină).

Principalii factori de virulență ai campylobacteriilor sunt mobilitatea, aderența la celulele epiteliului mucoasei intestinale, capacitatea invazivă şi sinteza toxinelor.

Mobilitatea permite celulei bacteriene să se deplaseze împotriva mişcărilor peristaltice, să penetreze stratul de mucus şi să colonizeze enterocitele. Mucina, o glicoproteină cu masă moleculară mare, ce conține L-fructoză, acționează ca un chemoatractant pentru *Campylobacter.*

Adezinele la *Campylobacter* sunt proteine extramembranare (CadF, JlpA, CapA) şi periplasmice (Peb1, Cj1496c). S-au descris structuri de tip 'piedestal', asemănătoare cu cele induse de infecția cu EPEC. Microvilii celulelor epiteliale se dezorganizează, iar bacteriile se agregă la joncțiunile intercelulare. Ulterior aderenței, *C. jejuni* secretă un set de proteine (*Campylobacter invasion antigens* – Cia), translocate în citoplasma celulei gazdă, al căror rol în patogenitate nu a fost elucidat. Campylobacteriile pot utiliza sideroforii produşi de alte bacterii din lumenul intestinal pentru a prelua Fe din compuşi ai hemului.

Mai multe specii ale genului *Campylobacter* (C. *jejuni, C. coli, C. lari, C. fetus* şi *C. uppsaliensis*), produc toxina de tip CDT (*cytolethal distending toxin*), care acționează prin blocarea ciclului celular în faza G_2, prin inhibiția CDC2 kinazei determinând astfel distensia celulară.

Lipopolizaharidele din structura membranei externe, caracterizate printr-o mare variabilitate structurală, sunt implicate în apariția complicațiilor autoimune, iar polizaharidele capsulare servesc la serotipizare.

C. jejuni (raportat în 90–95% din infecțiile cu *Campylobacter*) şi *C. coli* (5–10%) au fost identificați ca fiind cei mai importanți agenți etiologici bacterieni ai gastroenteritelor umane.

C. jejuni şi *C. coli* nu se multiplică în afara mediului intestinal al gazdelor, dar supraviețuiesc în anumite condiții de umiditate şi căldură, fără expunere la razele solare. Contaminarea se poate realiza direct (contactul uman cu pielea contaminată de fecale a animalelor, prin preluarea pe mâinile omului) sau indirect (consum de apă potabilă şi vegetale crude şi alte tipuri de alimente contaminate încrucişat, contactul cu apele de îmbăiere contaminate). Un rol în transmiterea infecției îl au vectorii (muştele pot contamina alimentele). Principala sursă a infecției rămâne carnea de pasăre contaminată în fluxul de producție în abator. Alte categorii de alimente identificate ca posibile surse ale infecției sunt carnea de porc insuficient preparată termic, apa potabilă tratată necorespunzător, lapte crud sau pasteurizat insuficient.

Campylobacteriozele pot avea o perioadă de incubație de 1–10 zile, media fiind de 2–5 zile. Simptomele sunt nespecifice, asemănătoare cu cele declanşate de alți patogeni enterici (*Salmonella* sp., *Shigella sp., E. coli*): febră (până la 40°C), cefalee, mialgie, dureri abdominale de tip acut, stare de rău general, vomă şi diaree (de la diaree apoasă până la diaree profuză şi hemoragică). Pot apărea şi simptome de pseudoapendicită datorate enteritei cu adenită mezenterică. Infecția enterică netratată durează în medie aproximativ o săptămână, cu vindecare spontană. S-au semnalat şi cazuri cu persistența simptomatologiei până la 3 săptămâni. Pacienții pot deveni excretori asimptomatici ai bacteriei timp de 1–2 luni. Mai rar pot apărea complicații care includ hepatite, colecistite, pancreatite, cistite, sindromul colonului iritabil, avort septic, sindrom uremic hemoragic, meningite, osteomielite şi septicemii (la pacienții imunocompromişi).

Complicațile postinfecțioase sunt reprezentate de afecțiuni autoimune, precum sindromul Guillain-Barré (GBS – inflamația şi demielinizarea nervilor, a cărei consecință este paralizia musculară flască ascendentă, progresivă, acută, tulburări de percepție senzorială) cu varianta sa, sindromul Miller Fisher (MFS – oftalmoplegie, lipsa reflexelor şi incoordonare), eritem nodos şi artrite reactive. 30–50% din cazurile de GBS au fost corelate cu existența anterioară a unei infecții cu *C. jejuni.*

Tratamentul infecțiilor necomplicate nu este indicat, vindecarea fiind spontană. Totodată sunt raportate creşteri ale rezistenței tulpinilor *Campylobacter* spp. la substanțele antimicrobiene utilizate în tratament, mai ales la macrolide şi fluoroquinolone.

C. pylori este pozitiv pentru testul ureazei, acest caracter reprezentând un posibil mecanism al patogenezei (protecția față de pH acid) şi un criteriu fundamental pentru detectarea rapidă. Este microaerofil, creşte la 37°C, dar nu la 25–30°C. *C. pylori* este asociat cu gastrita cronică şi cu forma

cronică activă. La pacienții cu inflamație gastrică și pozitivi pentru *C. pylori*, celulele mucoasei sunt lezate, iar după tratamentul cu citrat de bismut coloidal sau cu salicilat de bismut, numărul celulelor bacteriene scade semnificativ și inflamația dispare.

Diagnosticul campylobacteriozelor se stabilește prin detectarea *Campylobacter* spp. în materiile fecale. Pentru izolare probele se însămânțează direct pe mediile selective sau inițial în medii pentru îmbogățire selective și apoi sunt subcultivate pe medii solide selective (tabelul 28).

Tabelul 28.

Caracteristicile fenotipice ale principalelor specii termofile ale genului *Campylobacter* (după Euzéby, 2010).

Caracteristici	*C. jejuni*	*C. coli*	*C. lari*	*C. upsaliensis*
Morfologie	Bacili mici curbați	Bacili mici curbați	Bacili mici curbați	Bacili mici curbați
Mobilitate	caracteristică	caracteristică	caracteristică	caracteristică
Creștere microaerobioză la 25°C	–	–	–	–
Creștere aerobă la 41,5°C	–	–	–	–
Oxidaza	+	+	+	+
Catalaza	+	+	+	– sau slab
Hidroliza hipuratului	+	–	–	–
Indoxil acetat	+	+	–	+
Hemoliză α	±	–	±	±

Mediile selective conțin diferite substanțe antimicrobiene (trimetoprim, vancomicină, amfotericină, rifampicină, cefoperazonă și cicloheximidă), care inhibă dezvoltarea altor bacterii din conținutul intestinal și a fungilor. Mediile selective pot fi împărțite în două grupe: medii cu sânge și medii cu cărbune. Anumite componente din sânge și cărbunele au rolul de a neutraliza derivații oxigenului (peroxizii și superoxidul) care se pot forma când mediile sunt expuse la lumină. Derivații reducerii parțiale a O_2 au efect toxic asupra campylobacteriilor datorită lipsei peroxidazei și SOD la aceste bacterii.

Campylobacteriile se dezvoltă optim într-o atmosferă cu 5–10% O_2, 5–10% CO_2 și 5–9% H_2. Timpul de incubare este de 4–6 ore la 37°C pentru mediile de îmbogățire și apoi 44 ± 4 ore la 41,5°C, iar pentru cele selective, 44 ± 4 ore la 41,5°C. Coloniile sunt polimorfe, gri lucioase, bombate sau gri metalizate pe mediile cu cărbune (fig. 272, 273), semitransparente sau opace, bombate sau difluente, nehemolitice sau rar slab hemolitice, pe mediile neselective cu sânge) (fig. 274, 275); la colorația Gram se observă bacili curbați sau forme cocoide (fig. 276–277).

Fig. 272. Colonii de *Campylobacter* spp. pe suprafața agarului Karmali (colonii gri opace, tip S).

Fig. 273. Colonii de *Campylobacter* spp. pe suprafața agarului CCDA (*Campy* Blood-Free Selective Medium) (colonii gri opace, tip R, metalizate).

Fig. 274. Colonii de *Campylobacter* spp. pe suprafața agarului Columbia (colonii semitransparente, tip S).

Fig. 275. Detaliu cultură de *Campylobacter* spp. pe suprafața agarului Columbia (aspect difluent).

Fig. 276. Campylobacter spp. – frotiu din cultură de 44 ± 4 ore pe mediu solid. Colorație Gram. Bacili curbați, în formă de S, virgulă, „pescăruș în zbor" sau spiralați, x 1000.

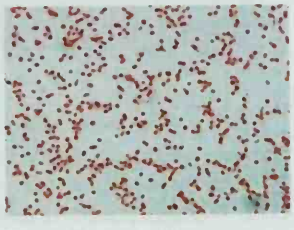


Fig. 277. Campylobacter spp. – frotiu din cultură de 70 ± 2 ore pe mediu solid. Colorație Gram, forme cocoide, x 1000.

Agentul infecțios se poate evidenția direct, prin examinarea biopsiilor de mucoasă gastrică colorate Gram. Metoda oferă rezultate certe în proporție de 85%.

12.2.2. Familia *Helicobacteriaceae*

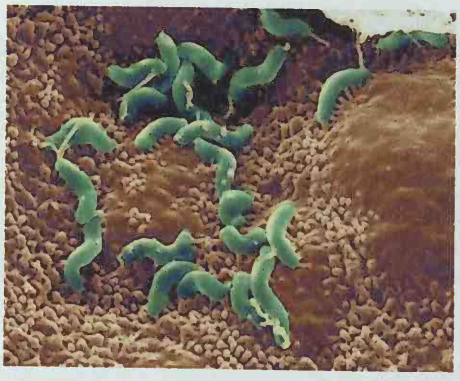


Fig. 278. H. pylori aderat la mucoasa gastrrică – imagine de microscopie electronică de *scanning* (http://www.diasource-diagnostics.com/en/Products/Rapid-Tests/Gastrointestinal-Metabolism/Helicobacter-Pylori-Hpylori/Hpylori-Card-20-tests).

Cuprinde genurile *Helicobacter* şi *Wolinella*. Alături de familia *Campylobacteraceae* face parte din clasa *Epsilonproteo-bacteria*, conform ultimei ediții *Bergey's Manual*.

Helicobacter pylori este o bacterie Gram negativă, spiralată (fig. 278), mobilă, microaerofilă şi capnofilă (necesită pentru creştere atmosferă de CO_2).

În 1980, Marshall a demonstrat raportul cauzal dintre aceste bacterii şi ulcerul duodenal prin ingestia unei culturi bacteriene, la interval de o săptamână dezvoltând simptome de gastrită acută, cu evidențierea prezenței bacteriei în biopsiile de mucoasă gastrică. Importanța descoperirii *H. pylori* a fost recunoscută în 2005 prin acordarea premiului Nobel pentru medicină cercetătorilor australieni B. Marshall şi R. Warren, care au reuşit să izoleze şi să cultive bacteria, corelând prezența acesteia cu diferite afecțiuni gastrointestinale.

Deşi populează compartimentul gastric, nu creşte la pH acid. Mucusul gastric protejează mucoasa de coroziunea acidă şi are proprietăți de tampon. Pe fața luminală a stratului de mucus, valoarea pH este 1,0–2,0, iar pe fața epitelială (sub stratul de mucus), 7,4. *H. pylori* se localizează în profunzimea stratului de mucus, la valoarea pH fiziologică a suprafeței epiteliului.

Factorii de virulență ai *H. pylori* sunt, în primul rând, enzimatici (fig. 279): o *protează* care scade vâscozitatea mucusului şi uşurează deplasarea flagelară a celulei bacteriene; *ureaza* hidrolizează ureea care difuzează din sânge şi produce NH_4, cu efect de tampon al HCl ce tinde să difuzeze prin stratul de mucus; *mobilitatea flagelară* prin care bacteria traversează rapid stratul de mucus şi ajunge la suprafața epiteliului.

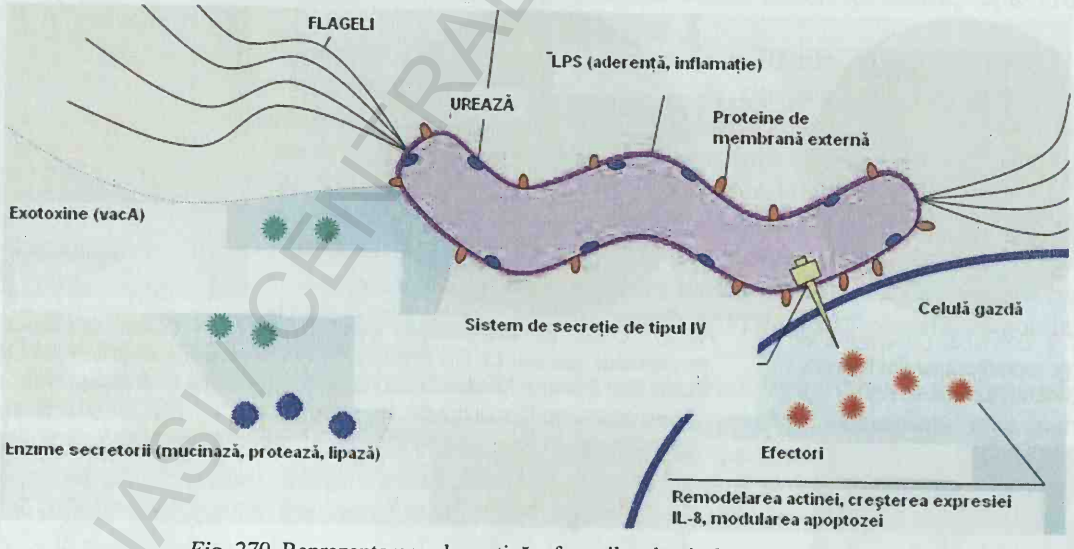


Fig. 279. Reprezentarea schematică a factorilor de virulență la *H. pylori* (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:H_pylori_virulence_factors_en.png).

Majoritatea tipurilor de *H. pylori* conțin VacA, o exotoxină care se inseră în membrana celulara epitelială şi formează un canal selectiv hexameric, prin care pot fi eliberați bicarbonați şi anioni organici. În funcție de expresia toxinei vacuolizante VacA şi a citotoxinei asociate CagA (care produce reorganizări ale citoscheletului celulelor epiteliale) se disting 2 fenotipuri: I (VacA+, CagA+)

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

şi II (VacA-, CagA-). Tulpinile tip I induc un raspuns inflamator gastric mai intens şi se asociază mai frecvent cu ulcerul, neoplazia gastrică şi limfomul MALT.

Dintre proteinele de suprafaţă cu rol de adezine, cea mai cunoscută este BabA (78 kDa), care se leagă de Ag de grup Lewis exprimat de celulele gastrice.

Genele de virulenţă sunt localizate pe insula de patogenitate *cag*, evidenţiată la aproximativ 60% din tulpinile izolate. Din grupul de 20 de gene localizat pe această insulă face parte şi gena *picB*, al cărei produs induce secreţia citokinelor proinflamatorii.

Infecţia cu *H. pylori* este totdeauna cronică şi asociată cu leziuni de gastrită cronică şi hipoclorhidrie. Rareori produce ulcer gastric sau duodenal (fig. 280). Bacteria invadează celulele epiteliale într-o măsură limitată. Mucoasa epitelială este lezată sub acţiunea LPS, a NH_4 şi a procesului invaziv (fig. 281).

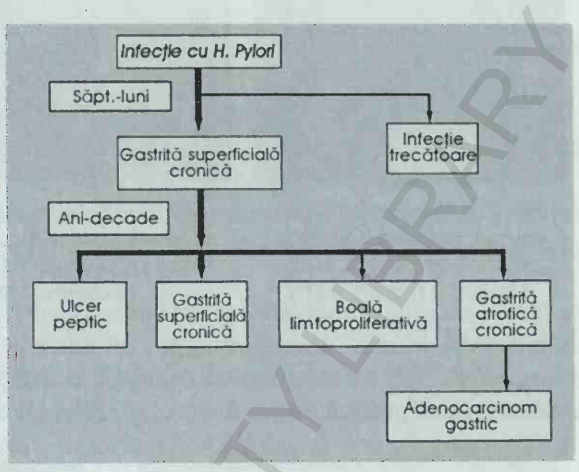


Fig. 280. Patogenia infecţiei cu *Helicobacter pylori* (Harrison, 2000).

Gastrita se caracterizează prin inflamaţia mucoasei, cu infiltrarea PMN şi a monocitelor atât în stratul epitelial, cât şi în lamina propria.

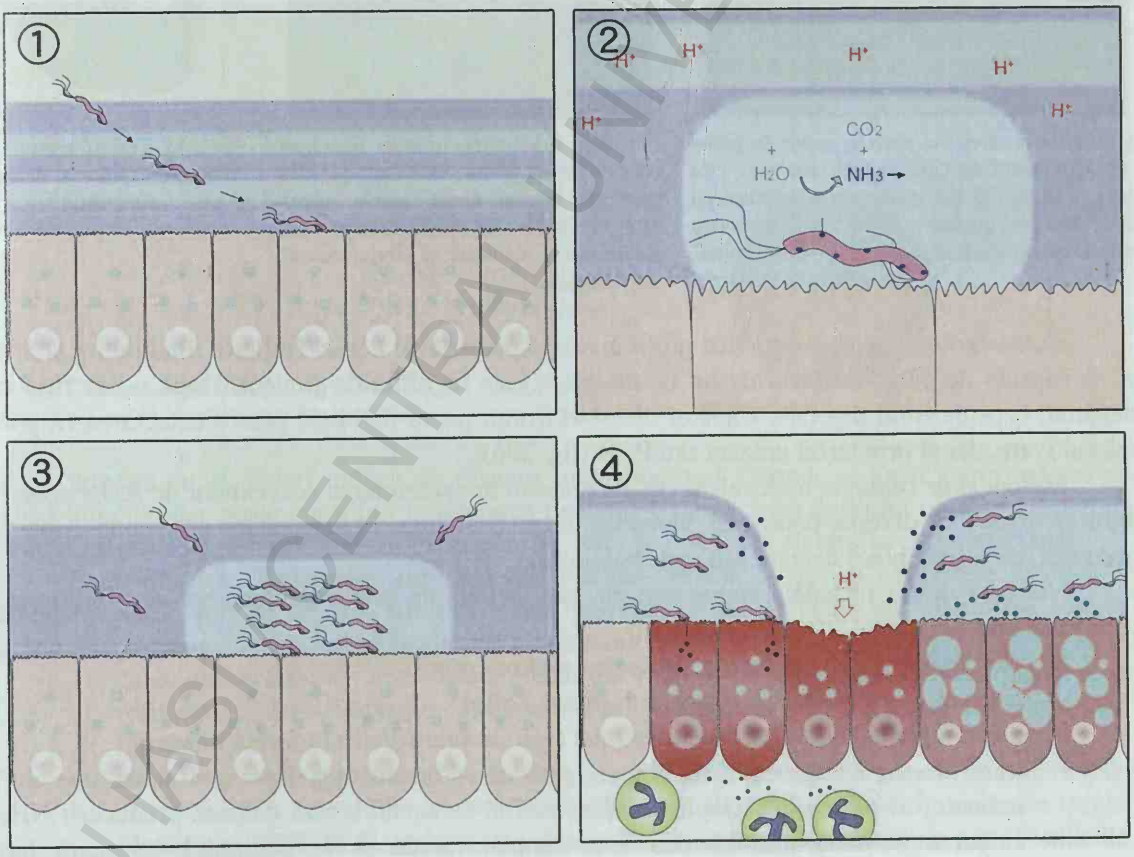


Fig. 281. Diagrama modificărilor induse de *H. pylori* la nivelul mucoasei gastrice: penetrarea stratului de mucus, aderarea la suprafaţa celulelor epiteliale, producerea de NH_3 sub acţiunea ureazei, apariţia focarului inflamator, necroza celulelor epiteliale ale mucoasei şi apariţia ulceraţiei gastrice (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:H_pylori_ulcer_diagram.png).

Pentru *diagnostic*, metodele invazive permit evidenţierea bacteriei *H. pylori* sau a ureazei bacteriene în probele de mucoasă gastrică obţinute prin biopsie şi examinate histologic.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY
B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI BIOLOGIE

Fig. 282. H. pylori în biopsia mucoasei gastrice. Colorație cu acridin orange, x 1000 (Megraud și Lehours, 2007).

Fig. 283. H. heilmannii în biopsia mucoasei gastrice după colorația cu hematoxilin-eozină (Megraud și Lehours, 2007).

Histologia permite diagnosticul direct pentru *H. heilmannii* care nu poate fi cultivat și poate fi ușor identificat datorită morfologiei tipice (fig. 282, 283): este mai lung decât *H. pylori,* cu 6–8 spirale, nu aderă la celulele epiteliale, este de obicei localizat în agregate la nivelul lumenului criptelor și poate induce gastrită (tranzitorie sau care poate evolua la ulcer gastric și limfom MALT).

Metodele neinvazive de diagnostic constau în detectarea anticorpilor specifici, a antigenului și a ureazei, în ser, salivă, urină, materiile fecale, aerul expirat (fig. 284, 285).

Fig. 284. Depistarea Ac anti-*H. pylori* în probe de ser. Antigenul specific marcat enzimatic este impregnat pe membrană, reacționează cu anticorpii din ser formând un precipitat evidențiat printr-o reacție de culoare în prezența unui substrat cromogen.

Fig. 285. Evidențierea ureazei Reactivul conține uree și un indicator pH. În prezența ureazei foarte active, ureea este scindată la CO_2 și NH_s determinând alcalinizarea mediului și virajul culorii indicatorului.

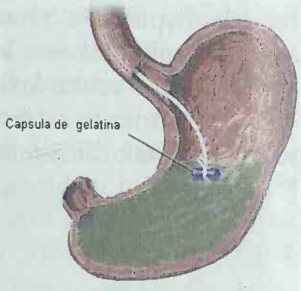


Fig. 286. Traseul capsulei de Enterotest (Adams, Atlas of Anatomy).

Enterotest este o procedură mai puțin invazivă propusă de Perez-Trallero, fiind numit și *String test.* O capsulă de gelatină fixată de un fir de nylon este înghițită de pacient. După o oră firul este îndepărtat, capsula fiind digerată. Capătul distal al firului poate fi folosit pentru detectarea *H. pylori* după cultivare, dar și prin testul ureazei sau PCR (fig. 286).

Metodele de biologie moleculară (PCR) constau în evidențierea secvențelor de ADN specifice pentru *H. pylori* în diverse prelevate: biopsiile de mucoasă gastrică recoltate prin endoscopie sau chirurgical, pe salivă, placă dentară sau materiale fecale.

Nici una dintre metodele enumerate nu este metodă de referință, deoarece sensibilitatea lor este asemănătoare.

Identificarea *H. pylori* se face pe baza mai multor criterii:

- intervalul de creștere a culturii, minimum 3 zile;
- morfologia celulelor, cu aspect spiralat (spirele sunt rigide) în forma literei S;
- *testul ureazei*: fragmentul de biopsie gastrică se însămânțează pe mediul cu uree, cu un indicator al valorii pH. După 1-2 zile, mediul se alcalinizează datorită producerii NH_4 și culoarea se modifică. Metoda este simplă, rapidă și se utilizează pe scară largă. Rezultatele fals pozitive apar la pacienții cu aclorhidrie, a căror mucoasă gastrică este colonizată cu bacterii ureazo-pozitive ce colonizează cavitatea orală și sau/stomacul.

Activitatea ureazei se poate evidenția *in vivo*: ureea marcată cu C^{13} (izotop stabil, neradioactiv) sau C^{14} (izotop instabil, radioactiv), administrată pacienților sub formă de soluție, este rapid hidrolizată de urează cu formarea NH_4^+ și a CO_2. CO_2 marcat se absoarbe în sânge, este

transportat în plămâni şi se elimină în aerul expirat. Cuantificarea C^{13} se face prin metoda spectroscopiei de masă (foarte costisitoare). Metoda determinării C^{14} ese mai convenabilă. Detectarea *H. pylori* în scaun este metoda curentă de monitorizare a pacienţilor după tratament.

După infecţie, în serul pacienţilor se detectează IgM specific, iar ulterior, IgG şi IgA. Anticorpii persistă în ser şi în secreţia mucoasă, chiar după eradicarea infecţiei.

Patologie. H. pylori aderă la epiteliul mucoasei gastrice şi produce un răspuns inflamator local, cu eliberarea unei chemokine şi influxul leucocitelor. Majoritatea celor infectaţi nu dezvoltă simptome clinice, dar circa 5% prezintă unul dintre cele două răspunsuri, foarte diferite:

- la unii indivizi, infecţia cu *H. pylori* induce eliberarea excesivă a gastrinei din celulele epiteliului mucoasei, care stimulează secreţia de HCl din celulele parietale ale glandelor fundice şi dezvoltarea ulcerului;
- la alţii, inflamaţia cronică are efect opus, ducând la atrofia stomacului, asociată cu reducerea cantităţii de HCl şi creşterea riscului de carcinom gastric. Rareori, în infiltratul limfoid cronic al stomacului, din limfocitele B se dezvoltă limfomul MALT, dependent în evoluţia sa de stimularea antigenică cu *H. pylori* sau de citokinele proinflamatorii. După eliminarea eficientă a infecţiei cu *H. pylori*, limfomul MALT poate să regreseze.

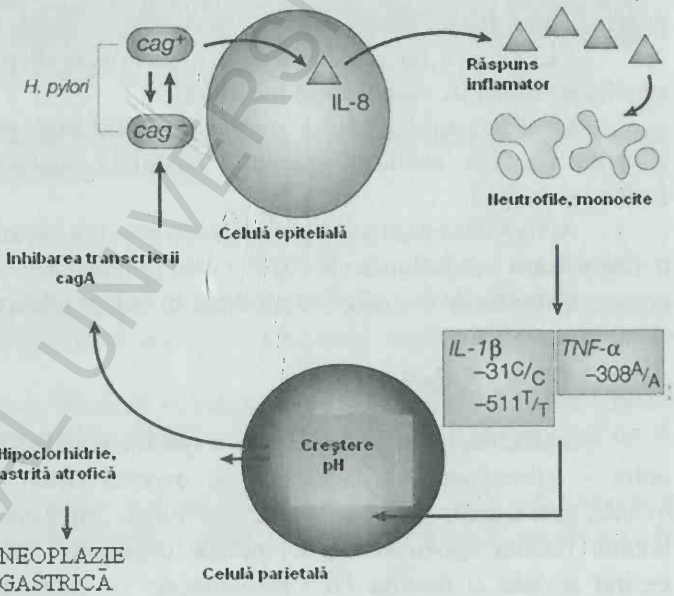


Fig. 297. Interrelaţiile dintre *H. pylori* şi organismul gazdă (după Peek şi Blaser, 2002).

Infecţia cu *H. pylori* induce un răspuns imun humoral sistemic şi local, care însă nu poate eradica infecţia, dar poate contribui la alterarea tisulară. Unii pacienţi dezvoltă un răspuns autoimun faţă de ATP-aza H/K din celulele parietale gastrice, care se corelează cu atrofia corpului gastric.

Epidemiologie. Rezervorul infecţiei este exclusiv uman: *H. pylori* se găseşte la circa 15% dintre persoanele sub 30 de ani, dar prevalenţa purtătorilor creşte odată cu vârsta. Se admite că bacteria se transmite de la persoană la alta, pe următoarele căi:

- calea oral-orală, prin intermediul picăturilor mici de salivă (aerosoli) contaminată datorită refluxului gastro-esofagian; *H. pylori* este prezentă în placa dentară a persoanelor cu infecţie gastrică;
- calea fecal-orală, prin materiile fecale infectate odată cu trecerea sucului gastric în intestin este principala cale de transmitere a infecţiei în ţările subdezvoltate. În materiile fecale s-a identificat ADN de *H. pylori*; apa şi alimentele vegetale contaminate pot fi vehicule de propagare a infecţiei;
- calea gastro-orală, prin vomă în timpul episoadelor de gastroenterită, pare a fi importantă pentru transmitere la copiii care trăiesc în condiţii precare de igienă. *H. pylori* a fost cultivat din vomă.

Gastroenterologii vin în contact cu secreţiile digestive ale bolnavilor şi astfel sunt mai expuşi riscului de infecţie.

BCU "LUCIAN BLAGA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Metronidazolul asociat cu sărurile de bismut ale acidului salicilic sau citric sterilizează circa 80% dintre pacienţii infectaţi cu *H. pylori.*

Cultivare. H. pylori se cultivă pe medii speciale: bulion de cord-creier de vită, agarizat, cu adaos de sânge (5–10%), ser, gălbenuş de ou, amidon, albumină bovină sau cărbune. Recent au fost propuse sulfatul feros, piruvatul de sodiu şi mucina de porc, isovitalex (2%) şi hemina (10 mg/l). Se poate adăuga uree (20 g/l) şi un indicator de pH (roşu fenol) pentru a identifica coloniile ureazo-pozitive. Totuşi, o cantitate mare de uree poate să inhibe creşterea bacteriei prin creşterea pH. Pentru inhibiţia creşterii microbiotei asociate, se foloseşte mediul selectiv suplimentat cu antibiotice (vancomicina, teicoplanina care inhibă cocii Gram pozitivi; polimixina, acidul nalidixic, colistinul, trimetoprimul sau cefsulodinul care inhibă bacilii Gram negativi şi antifungice – nistatin sau amphotericina B). Creşterea optimă se înregistrează la pH 6,0–7,0, la 37°C, într-o atmosferă care conţine 5% O_2 şi 5–10% CO_2. Nu creşte în aerul atmosferic şi nici în anaerobioză. În culturile expuse la aerul atmosferic, celulele se fragmentează şi apar forme cocoide, atipice. *H. pylori* supravieţuieşte la pH mai mic de 4 şi începe să crească la pH mai mare de 5.

Creşterea unor colonii mici, circulare, de tip S cu diametrul de 1 mm, este observată după 3–4 zile pe medii selective, cultivate din biopsii gastrice. Activitatea hemolitică nu se observă imediat, dar poate să apară la câteva zile, la 4°C.

Examinarea microscopică evidenţiază bacili drepţi sau curbaţi. Forma spiralată şi mobilitatea sunt legate direct de vâscozitatea mediului.

Identificarea bacteriilor cultivate se bazează pe evidenţierea prezenţei anumitor enzime: citocrom oxidaza, catalaza, ureaza şi facultativ, glutamil- transpeptidaza, leucin- aminopeptidaza, fosfataza alcalină.

Activitatea enzimatică proeminentă este cea ureazică. Singura sursă de C este glucoza, pe care o fosforilează sub acţiunea catalitică a unei glucokinaze.

Culturile de *H. pylori* se conservă în bulion glicerinat (glicerolul este agent crioprotector).

12.3. Spirochete

Spirochetele (lb. greacă, *spira* = spiră; *chaete* = fir de păr) formează un grup mare (cu statut de ordin – *Spirochaetales*), heterogen de bacterii Gram negative, chemoheterotrofe, spiralate, fine, mobile, distincte din punct de vedere morfologic, filogenetic şi al tipului de mobilitate, grupate în două familii: familia *Spirochaetaceae* include organisme spiralate, mari, libere, răspândite mai ales în mediul acvatic şi familia *Treponemataceae*, ce cuprinde spirochetele de interes clinic, aparţinând genurilor *Treponema, Leptospira* şi *Borrelia.*

Organitul de mobilitate este reprezentat de *filamente axiale* sau *endoflageli* cuprinşi într-o *teacă periplasmică situată între teaca externă* şi *protoplast* (fig. 298, 299).

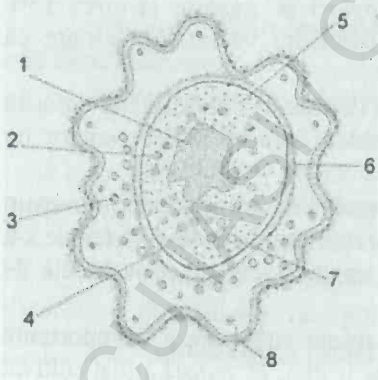


Fig. 298. Secţiune transversală printr-o spirochetă (1 – nucleoid, 2 – ribosomi, 3 – filamente axiale, 4 – teacă periplasmică, 5 – protoplast, 6 – perete celular, 7 – microtubuli, 8 – teaca externă) (http://www.studentsguide.in/microbiology/mollicutes-lforms-rickettsias-chalmydias/spirochaetes.html).

Fig. 299. Structurile superficiale ale unei bacterii spiralate (1 – punctul de inserţie al filamentelor axiale, 2 – filamente axiale, 3 – protoplast, 4 – teacă externă) (http://www.studentsguide.in/microbiology/mollicutes-lforms-rickettsias-chalmydias/spirochaetes.html).

Endoflagelii conferă mobilitate ''în tirbuşon'', ca o adaptare la deplasarea în medii vâscoase (mucoasa bucală, gastrointestinală, sedimente, mâl). Cînd endoflagelii se rotesc în aceiaşi direcţie, se

prespune că cilindrul protoplasmatic se roteşte în direcţie opusă, asigurând astfel rotirea tecii externe în formă de tirbuşon şi deplasarea celulei bacteriene. Pe medii solide, endoflagelii determină mişcări de flexie şi îndoire a celulei bacteriene, care au ca rezultat deplasarea prin alunecare (fig. 300).

Deoarece sunt foarte fine, în stare vie aceste organisme se evidenţiază numai la microscopul cu fond întunecat (fig. 301).

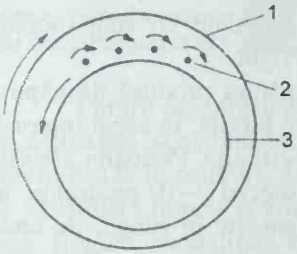


Fig. 300. Reprezentarea sensului de mişcare al componentelor unei bacterii spiralate (1 – protoplast, 2 – filamente axiale, 3 – teacă externă) (http://www.studentsguide.in/microbiology/mollicutes-lforms-rickettsias-chalmydias/spirochaetes.html).

Fig. 301. Celule de *Leptospira,* observate la microscopul cu fond întunecat.

Spirochetele se pot transmite prin contact direct sau indirect (apă contaminată, vectori) şi pot produce boli venerice, antropozoonoze sau boli profesionale.

12.3.1. Genul *Borrelia*

Reprezentanţii genului *Borrelia* produc *infecţii recurente* (infecţii ale căror simptome se succed la diferite intervale de timp legate de durata ciclului de multiplicare bacteriană), cunoscute în clinică sub denumirea de *boala Lyme*.

S-au identificat cel puţin 3 subspecii de *Borelia: B. burgdorferi, B. afzelii* şi *B. garinii*. Boala Lyme, transmisă de căpuşe, cu manifestările clinice specifice agentului patogen este produsă de *B. burgdorferi*.

Borrelia se cultivă pe medii fluide cu sânge, ser sau fragmente de ţesut şi în oul embrionat (inoculare în membrana corioalantoidiană). După pasajul repetat *in vitro*, *Borrelia* îşi pierde repede virulenţa.

Boreliile sunt sensibile la uscăciune şi de aceea sunt total dependente de gazdă: ele s-au găsit numai la artropodele sau la gazdele vertebrate pe care seama cărora artropodele se hrănesc hematofag. *B. burgdorferi* este transmisă la om, de căpuşele ixodide (*Ixodes ricinus*).

B. burgdorferi este un organism flexibil, cu lungimea de 10–30 μm, cu 3—10 spire laxe, cu helixul de stânga (se roteşte antiorar). Pasul spiralei este de 2–4 μm, iar celulele se deplasează prin mişcări de rotaţie şi torsiune. Structural, la microscopul electronic, *Borrelia* este alcătuită dintr-o membrană (strat, teacă) externă trilaminară ce înconjoară spaţiul periplasmic în care se găsesc 7–11 flageli şi compartimentul intern – cilindrul protoplasmatic. *In vivo*, celula este tapetată cu un strat mucos amorf, alcătuit din componente ale gazdei, pierdut uşor prin spălare. Un înveliş asemănător se găseşte pe suprafaţa *T. pallidum*.

Membrana (teaca) externă, cu o structură trilaminară, este alcătuită din proteine, lipide şi glucide. *In vitro*, în prezenţa anticorpilor specifici şi a complementului, membrana externă formează vezicule, o reflectare a senescenţei şi morţii celulare.

Proteinele majore ale membranei externe (A, B, C, D, E, F) asigură variabilitatea antigenică a agentului patogen.

Flagelii au inserţie subterminală, bipolară, la cilindrul protoplasmatic al *B. burgdorferi,* sunt aşezaţi paralel cu axul lung şi se suprapun în zona de mijloc a celulei. Filamentele flagelare de *B. burgdorferi* sunt alcătuite dintr-un singur tip de moleculă proteică, numită flagelină. Anticorpii anti-flagelină au titru crescut în toate stadiile infecţiei, dar nu sunt protectori.

Structurile genetice sunt neobişnuite: cromosomul este linear (910725 pb), iar plasmidele, în număr de 21 sunt atât lineare (12), cât şi circulare (9).

Borrelia poate fi cultivată pe mediu artificial, din sânge, lichid cefalorahidian şi din lichidul sinovial, dar mai ales din leziunile tegumentare de *eritema migrans* (EM). Se multiplică lent, timpul de generaţie fiind de 8–15 ore pentru *B. burgdorferi* şi de circa 26 ore pentru *B. recurentis*. Pasajele repetate pe mediul artificial modifică structura antigenică şi celulele îşi pierd infecţiozitatea. Pe preparatul proaspăt, la microscopul cu fond clar sau cu contrast de fază, celulele vii sunt mobile. *Borrelia* poate fi uşor evidenţiată pe frotiuri de sânge colorate Giemsa sau Wright.

Boala Lyme este iniţiată prin infecţia localizată a pielii după înţepătura produsă de căpuşa *Ixodes*. După perioada de incubaţie de 3–10 zile, debutul este abrupt, cu stare febrilă. În acest interval, *Borrelia* se găseşte în sânge. Febra persistă câteva zile, apoi scade pentru 4–10 zile. Perioada afebrilă este urmată de un nou atac febril, cu frisoane şi stare de rău general. Se succed 3–10 recurenţe. În perioadele febrile, care corespund unui ciclu de multiplicare, *Borrelia* se găseşte în sânge, de unde lipseşte în perioadele afebrile. Maladia se caracterizează prin leziuni tegumentare în expansiune denumite *eritema migrans* şi oboseală, dureri de cap, artralgie, mialgie, febră, rigiditate a gâtului. Diseminarea spirochetei din leziunile tegumentare poate produce manifestări clinice mai severe: meningită, blocaj atrio-ventricular cardiac etc. Maladia Lyme cronică este caracterizată prin *artrită, nevrită, cardită*, care pot persista luni sau ani de zile după infecţie (fig. 302).

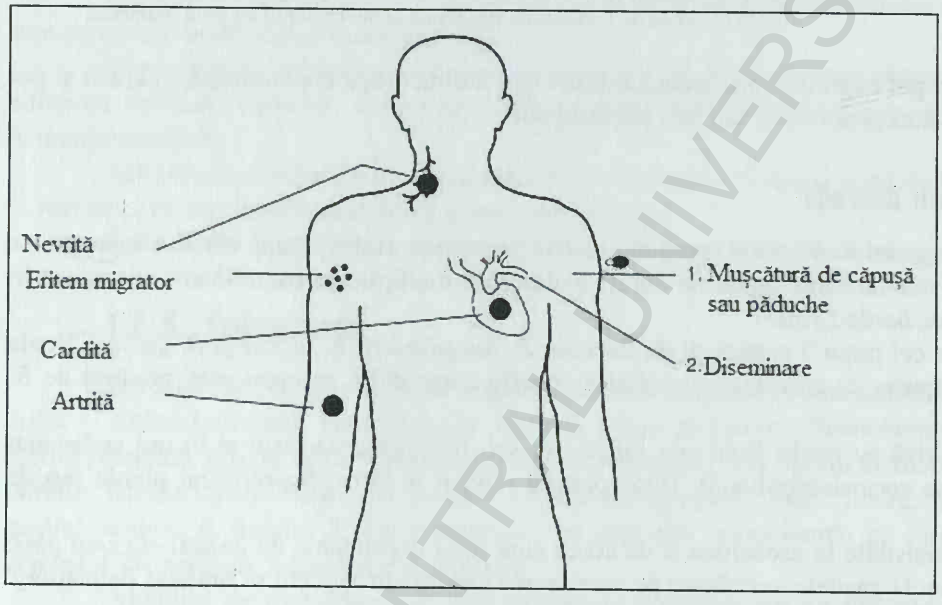


Fig. 302. Localizarea patologiei infecţiilor cu *Borrelia* (Baron, 1996).

În perioadele febrile este indusă sinteza anticorpilor specifici, iar recurenţa se încheie sub acţiunea anticorpilor care *in vivo* produc imobilizarea şi liza, iar *in vitro*, aglutinarea celulelor de *Borrelia*.

B. burgdorferi este transmisă la om prin injectarea cu saliva căpuşii. Bacteria aderă la glicozaminoglicanii membranei celulelor gazdei, iar ulterior migrează şi produce leziunile tegumentare caracteristice. Se disemineză pe cale limfatică sau prin sânge în musculatura striată şi în viscere.

Diagnosticul bolii Lyme este îngreunat de multitudinea simptomelor ce pot însoţi procesul infecţios. În intervalul febril se recoltează sânge. Pe frotiul colorat Giemsa, la microscopul optic se evidenţiază *Borrelia* cu spire largi, printre hematii (fig. 303).

Borrelia se poate evidenţia la microscopul optic după impregnare argentică sau prin microscopia cu fluorescenţă, cu anticorpi marcaţi (fig. 304, 305).

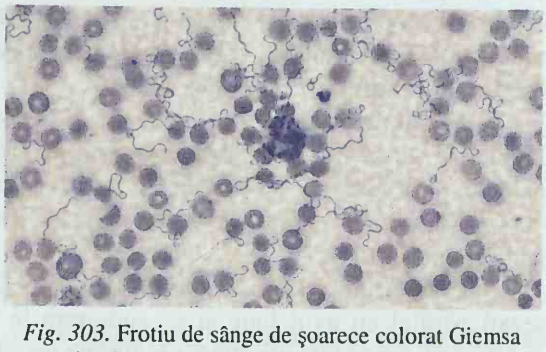


Fig. 303. Frotiu de sânge de şoarece colorat Giemsa cu spirochetemie masivă (Connoly şi Benac, 2005).

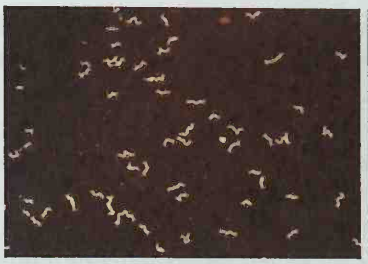


Fig. 304. Borrelia burgdorferi vizualizată prin tehnica imunofluorescenței (Schwan şi Piesman, 2002).

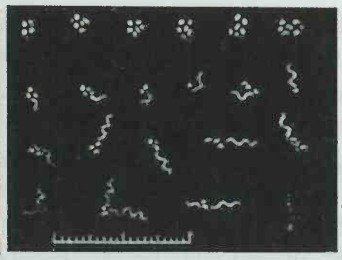


Fig. 305. Borrelia vizualizată prin metoda impregnării argentice (Dutton şi Todd, 1905–1907, citați de Burgdorfer, 1999).

Pentru diagnosticul *in vivo*, proba de sânge de la pacientul infectat se injectează intraperitoneal la animalele sensibile (şoarece alb, şobolan tânăr, hamster). La aceste animale, *B. burgdorferi* se diseminează în țesuturi, dar nu produce procese patologice. Semnul distinctiv al bolii Lyme – artrita – se manifestă numai la rozătoarele cu sistem imunitar imatur sau compromis. Diagnosticul serologic este singura modalitate clinică de evidențiere a infecției cu *B. burgdorferi*. Pentru tratament se recomandă amoxicilină (3–4 g/zi) timp de 10 zile sau doxiciclină (200 mg/zi).

Spirocheta *B. hermsii* produce *febra recurentă*, caracterizată prin valuri febrile, separate de intervale asimptomatice (fig. 306). Episoadele febrile sunt produse de populații de *Borrelia* care se disting antigenic. Fiecare populație de celule bacteriene induce sinteza anticorpilor specifici neutralizanți. Întotdeauna rămâne o populație mică de celule bacteriene viabile, rezistente la acțiunea anticorpilor, deoarece sunt variante antigenice distincte de populația parentală.

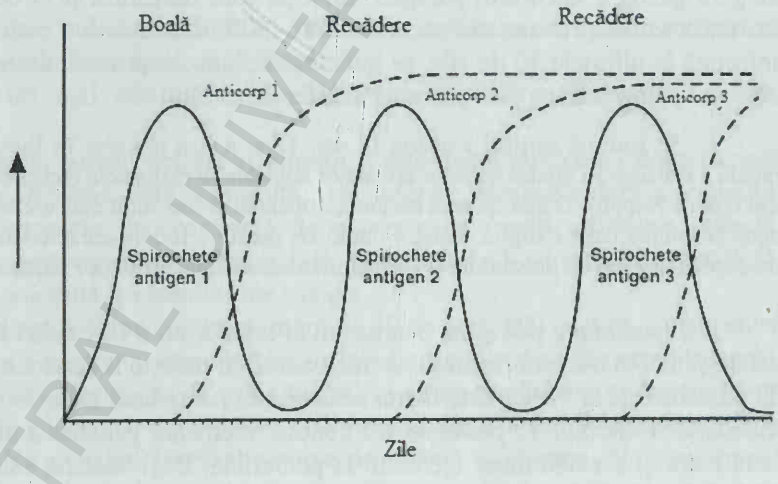


Fig. 306. Evitarea răspunsului imun umoral de către *Borrelia* prin mecanismul de variație antigenică (Baron, 1996).

Antigenul major al celulelor de *Borrelia* este o proteină majoră a membranei, cu caracter variabil (VMP), codificată de o familie de gene. Comutarea expresiei genelor acestei familii permite apariția, în timpul infecției, a unei mici populații de celule, care prin multiplicare va reface noua variantă antigenică (serotipică) de *Borrelia*, rezistentă la efectul anticorpilor.

La nivel individual, o singură celulă de *B. hermsii* are potențialul de a genera circa 40 de serotipuri diferite ale VMP. Rata de comutare a variantelor antigenice ale proteinei majore este de $1/10^3$–10^4.

VMP are rol important în localizarea tisulară a bacteriilor din g. *Borrelia*.

Proteina majoră de virulență prezintă variante distribuite în clase de molecule mari (37–40 kDa) şi mici (19–22 kDa). Genele codificatoare sunt localizate pe plasmide lineare, care se găsesc în copii multiple.

În zonele geografice în care febra recurentă este endemică, rezervorul de infecție este populația de rozătoare. De la acestea, *Borrelia* este preluată de căpuşele din genului *Ornithodorus*, în timpul hrănirii hematofage. La căpuşe, *Borrelia* se transmite pe verticală, transovarian şi se găseşte în toate țesuturile. La om se transmite în timpul hrănirii hematofage sau prin strivirea căpuşii pe leziunile tegumentare. Boala transmisă de căpuşe nu este contagioasă. Păduchii se infectează odată cu sângele cu care se hrănesc. După 4-5 zile, la o nouă hrănire, păduchele este sursă de infecție pentru alți indivizi umani, care se contaminează prin strivirea artropodului la locul leziunii tegumentare după înțepare.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Evaluarea eficienței chimioterapiei este foarte dificilă, datorită variabilității remisiei spontane a febrei, însă se presupune că doze unice de tetraciclină, eritromicină sau penicilină sunt suficiente pentru neutralizarea unui atac individual de febră.

12.3.2. Genul *Treponema*

Speciile de *Treponema* patogene pentru om au fost reclasificate în 1984: *T. pallidum* (agentul sifilisului veneric) este înrudită cu alte specii de *Treponema* patogene care produc boli nevenerice, ce pot fi diferențiate prin manifestările clinice; *T. pallidum* subsp. *endemicum* (produce sifilisul endemic sau bejel, întâlnit în Africa, Orientul Mijlociu şi Sud Estul Asiei, mai ales la copii, cu leziuni cutanate); *T. pallidum* subsp. *pertenue* (produce pianul, endemic în zonele tropicale, mai ales la copiii sub 15 ani, manifestat sub forma unor papule ulcerative la nivelul membrelor), *T. carateum* (pinta, endemică în Mexic, America Centrală şi de Sud, Filipine şi Pacific, produce leziuni papulare neulcerative, urmate de depigmentare şi hipercheratoză) (Norris, 1993).

Deşi treponemomatozele sunt considerate boli strict umane cu transmitere sexuală şi transplacentară, specia *T. cuniculi*, identică din punct de vedere morfologic cu *T. pallidum*, produce o infecție cu transmitere sexuală la iepure, care se manifestă prin leziuni minore la nivelul organelor genitale.

T. pallidum este o bacterie Gram negativă, cu lungimea de 5–15 μm, fină, spiralată helicoidal, mobilă, printr-o mişcare de rotație în jurul endoflagelului. Sifilisul este o boală* cronică, iar omul este singura gazdă a agentului patogen. Infecția este transmisă prin contact direct, de obicei sexual, din leziunile active primare sau secundare. 16–30% dintre cei care au avut contact sexual cu o persoană infectată în ultimele 30 de zile, se infectează clinic, deşi transmiterea propriu-zisă are o rată mai mare. Agentul patogen trece prin placentă şi infectează fătul.

*Se pare că sifilisul a apărut în sec. 17 şi a fost introdus în Europa de Cristofor Columb, cu difuzarea rapidă a maladiei în rândul trupelor armatelor angajate în războaiele europene (boala fiind cunoscută ca răul francez sau răul de Napoli). O altă ipoteză susține că boala ar fi fost mult mai veche, pe baza dovezilor arheologice care au adus la lumină oase (Anglia, Italia, Franța) ce prezintă leziuni caracteristice sifilisului. Agentul sifilisului a fost descoperit în 1905 de Schaudinn şi Hofmann în serozitățile leziunilor secundare, sifilitice.

T. pallidum, patogenă pentru om şi iepure, nu a fost cultivată pe medii artificiale, în culturi de celule şi nici în oul embrionat. Este microaerofilă, trăieşte la concentrația de 1–4% O_2, este distrusă rapid de uscăciune şi la 42°C. Este foarte sensibilă la *penicilină*, chiar în concentrații mici, fără fenomene de rezistență. Genomul *T. pallidum* nu conține elemente genetice transpozabile (EGT), ceea ce explică stabilitatea şi sensibilitatea agentului la penicilină. Deşi bacteria este sensibilă la penicilină, infecția se cronicizează din cauza persistenței sifilisului primo-secundar (mai ales în cazul populațiilor defavorizate), care creşte riscul transmiterii congenitale, rezistenței la tratament şi agresivității bolii la bolnavii de SIDA.

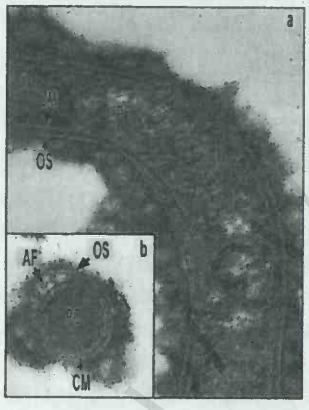


Fig. 307. Secțiune longitudinală ultrafină printr-o celulă de *T. denticola* (OS – teaca externă, CM – membrana citoplasmatică, PC – cilindru protoplasmatic) (Schultz şi colab., 1998).

Celelalte specii de *Treponema* pot fi cultivate uşor în mediul lichid, în condiții anaerobe sau microaerofile.

Structura. La exteriorul membranei citoplasmatice se găseşte un strat subțire de peptidoglican ce conferă stabilitate structurală, un flagel periplasmic – *endoflagelul* şi membrana externă (fig. 307).

Endoflagelul localizat în spațiul periplasmic permite mobilitatea caracteristică „de tirbuşon" (fig. 308), are diametrul de 17 nm şi se extinde pe mai mult de jumătatea lungimii celulei, în spațiul periplasmic, de la ambele capete ale celulei, spre zona de mijloc.

Fig. 308. Spirochete deplasându-se "în tirbuşon" într-un mediu vâscos (http://biosink.blogspot.com/2008-05-18 archive.html).

Filamentul flagelar are o teacă externă şi o componentă centrală alcătuită din cel puţin 4 polipeptide, omologe flagelinei. La fiecare capăt al spiralei îşi au originea 2–4 endoflageli, care se răsucesc în jurul celulei pe măsură ce se extind spre zona de mijloc.

Flagelul periplasmic sau endoflagelul este componenta structurală cea mai bine caracterizată la *T. pallidum*. Filamentele flagelului celor mai multe bacterii sunt polimeri ai unei singure subunităţi peptidice. În contrast, filamentul endoflagelar la *T. pallidum* este alcătuit din câteva proteine. Membrii grupului *Treponema*, conţin, de asemenea, filamente citoplasmatice, denumite fibrile, cu aspect de bandă (cu lăţimea de 7–7,5 nm), ce se întind pe lungimea celulei, chiar sub membrana citoplasmatică, paralele cu flagelul periplasmic. Funcţia lor nu este cunoscută.

Endoflagelul îşi păstrează configuraţia helicală după ce este eliberat în spaţiul periplasmic prin tratamentul cu detergenţi, ceea ce arată că aspectul spiralat este o proprietate structurală stabilă a endoflagelului şi nu depinde de asocierea cu corpul celulei. Fiecare proteină a flagelului este codificată de o genă proprie.

Teaca externă a celulei de *T. pallidum* este alcătuită în primul rând din glicozaminoglicani şi săracă în structuri proteice. Cardiolipina este un compus important al tecii externe. Membrana externă la *T. pallidum* conţine un număr foarte mic de proteine membranare interne. Dintre proteinele asociate membranei, multe sunt complexate cu lipidele (lipoproteine) şi sunt ancorate în membrana de *T. pallidum* prin componenta lipidică, asemănător altor lipoproteine bacteriene. Asociate membranei citoplasmatice sunt proteinele care leagă penicilina (PBP) şi sunt probabil implicate în sinteza peptidoglicanului.

Serul uman normal conţine adeseori cantităţi mici de anticorpi ce reacţionează cu polipeptidele de *T. pallidum* şi cu unele proteine ale endoflagelului.

Genomul este de câteva ori mai mic (1,14 Mb) decât al bacteriilor Gram pozitive sau Gram negative.

Fiziologie. T. pallidum este un parazit obligat al omului şi este una dintre cele câteva bacterii patogene care nu au fost cultivate *in vitro*. Este propagată prin infecţia intratesticulară a iepurelui, pentru scopuri de cercetare şi diagnostic. Incapacitatea de a creşte pe medii artificiale reflectă, probabil, dependenţa de sistemele protectoare ale celulei faţă de radicalii O_2, deoarece necesită O_2 pentru metabolism, dar este foarte sensibilă la efectele sale toxice.

Creşterea este lentă (timpul de diviziune este mai mare de 30 de ore), atât *in vivo*, cât şi pentru cele cultivate *in vitro*, ceea ce denotă existenţa unor limitări metabolice, consecinţe ale unor necesităţi neidentificate. *T. pallidum* metabolizează glucoza pe calea glicolizei cu un randament energetic foarte mic (2 molecule ATP/moleculă de glucoză), dar lipsesc enzimele ciclului acizilor tricarboxilici şi catena transportoare de electroni. Nu metabolizează alte surse de carbon şi energie. Nu sintetizează acizi graşi, pe care *T. pallidum* îi preia de la gazdă, dar posedă enzimele de conversie prin care moleculele gazdei sunt convertite în molecule proprii. Pentru preluarea macromoleculelor din mediu, *T. pallidum* posedă mecanisme speciale de transport. *T. pallidum* sintetizează ADN, ARN, proteine şi cel puţin anumiţi aminoacizi.

T. pallidum este negativă pentru testul producerii catalazei şi oxidazei, caractere ce se corelează cu condiţiile de microaerofilie necesare supravieţuirii *in vitro*. Enzimele sunt termolabile la temperatura corpului uman, ceea ce ar putea să explice rata scăzută de creştere a agentului patogen. Terapia sifilisului prin şoc termic a fost introdusă în 1918 şi a constat în administrarea sângelui de la pacienţii cu malarie (LaFond, 2004), urmată de tratamentul cu quinină.

Patogeneza. În condiţii naturale, *T. pallidum* infectează numai omul, singura gazdă naturală. Infecţia este transmisă prin contact sexual. Perioada de incubare este de 10–90 de zile, în funcţie de doza inoculată. *Doza infecţioasă 50* pentru iepurele inoculat intratesticular este de 57 de celule bacteriene. O persoană infectată poate să rămână contagioasă 3–5 ani. Infecţia mai veche de 5 ani nu este contagioasă.

T. pallidum este foarte invazivă: *in vitro* se ataşează rapid, prin una sau ambele extremităţi, de celulele epiteliale, fibroblastice, endoteliale umane şi de iepure. Structura celulară de aderenţă este matricea extracelulară, în primul rând fibronectina. *In vivo, T. pallidum* penetrează joncţiunile celulelor epiteliale ale mucoasei genitale, progresând prin mişcarea de rotaţie în jurul axului longitudinal („în tirbuşon"), uşurată de eliberarea hialuronidazei într-un material vâscos.

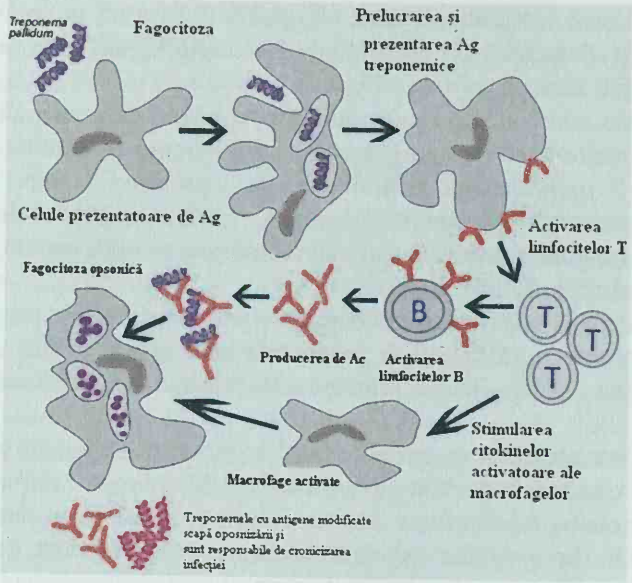


Fig. 309. Interacţiunea *T. pallidum* cu sistemul imunitar al gazdei. Explicaţii în text (www.metapathogen.com).

T. pallidum traversează celulele epiteliale şi ajunge repede în sânge şi în ţesuturile profunde. În celulele dermului induce sinteza metaloproteazei-1 care degradează componentele matricei (MMP-1). Enzima degradează colagenul şi uşurează pătrunderea agentului patogen în ţesuturile profunde. La situsul infecţiei este activat răspunsul inflamator. Pe suprafaţa celulelor endoteliale este indusă expresia moleculelor de aderenţă: ICAM-1, VCAM-1 şi selectina E. Reacţia inflamatorie este săracă în neutrofile. Neutrofilele lizează agentul patogen pe care îl fagocitează. *T. pallidum* este înglobată de celulele dendritice (CD), localizate în derm, în mucoasa rectală, în ţesutul cardiac (situsuri potenţiale ale infecţiei). CD stimulate eliberează citokine proinflamatorii: IL-1β, IL-6, IL-12, TNFα.

CD funcţionează ca o punte de legătură între imunitatea înnăscută şi cea adaptativă, deoarece prezintă antigenele microbiene celulelor T din ganglionii limfatici. Celulele T sunt stimulate de antigenele lipoproteice ale membranei externe şi de antigenele flagelare treponemice prezentate de CD (fig. 309). Celulele T ating densitatea maximă în focarul infecţios la 10–13 zile de la contactul contaminant, simultan cu macrofagele şi mediază reacţia de hipersensibilitate de tip întârziat faţă de *T. pallidum*.

Antigenele membranei externe şi cele flagelare induc sinteza anticorpilor IgM şi IgG.

T. pallidum se multiplică la locul inoculării, cu limfadenită regională moderată. Aproximativ 30% dintre cei infectaţi se vindecă spontan, fără leziuni clinice. Leziunea clinică *primară* denumită *şancru moale* apare la 3 săptămâni după expunere, este localizată pe tegument sau pe mucoasa aparatului genital, din care agentul patogen se diseminează. La bărbaţii homosexuali, leziunea primară este intrarectală, perianală, orală sau cu alte localizări interne, la cei heterosexuali este localizată pe penis, iar la femei, pe labia ori pe cervix. Din leziunea primară, *T. pallidum* se diseminează în ganglionii limfatici regionali şi de aici în sânge. Leziunea primară este nedureroasă şi de aceea diagnosticarea întârzie, se vindecă spontan, în 4–6 săptămâni. După acest interval, oriunde în organism, se dezvoltă leziunea *secundară*, *şancrul tare*, datorită procesului inflamator cu infiltrat limfocitar. Şancrul secundar progresează la ulceraţie, dar nu este purulent.

Sifilisul secundar apare la ¼ dintre cazurile netratate şi rezultă din multiplicarea *T. pallidum* în leziunile multiple tegumentare şi viscerale, în competiţie cu răspunsul imun humoral viguros. Leziunea secundară se vindecă spontan. În leziunile primare şi secundare se găseşte un număr mare de celule de *T. pallidum*, infecţioase. Manifestarea cea mai comună a sifilisului secundar este o erupţie eritematoasă mucocutanată diseminată. Rareori leziunile devin necrotice (sifilis malign). De cele mai multe ori leziunile secundare nu sunt evidente. În stadiul secundar, *T. pallidum* s-a găsit în biopsiile din ficat, iar complexele Ag-Ac se depun în glomerulii renali şi produc glomerulonefrită.

Deşi aparent se vindecă spontan, leziunile pot reveni după 2–10 ani. La alte 30% dintre persoanele infectate, infecţia cu *T. pallidum* poate să rămână inaparentă şi să parcurgă stadiile primar şi secundar fără leziuni clinice, dar pacienţii dezvoltă, la câţiva ani sau chiar câteva decade după infecţia iniţială, leziunile *sifilisului terţiar*, cu granuloame (gome sifilitice) în tegument, oase, ficat, leziuni degenerative ale SNC (pareză, tabes) sau cu leziuni cardiovasculare (anevrism aortic, insuficienţă valvulară aortică), cu puţine celule infecţioase (fig. 310, 311).

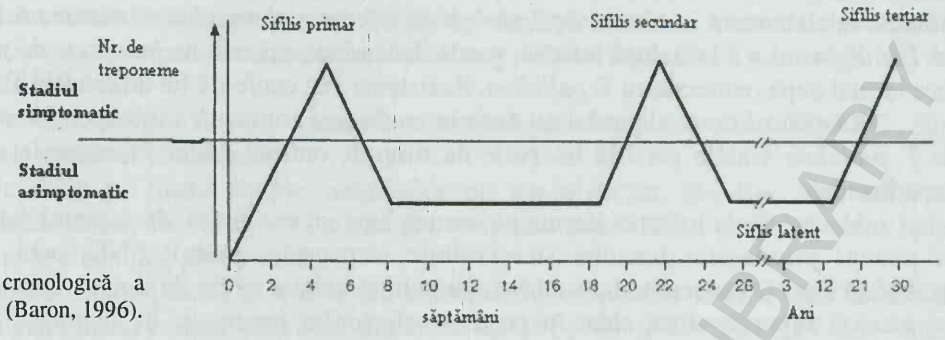


Fig. 310. Evoluția cronologică a infecției cu *T. pallidum* (Baron, 1996).

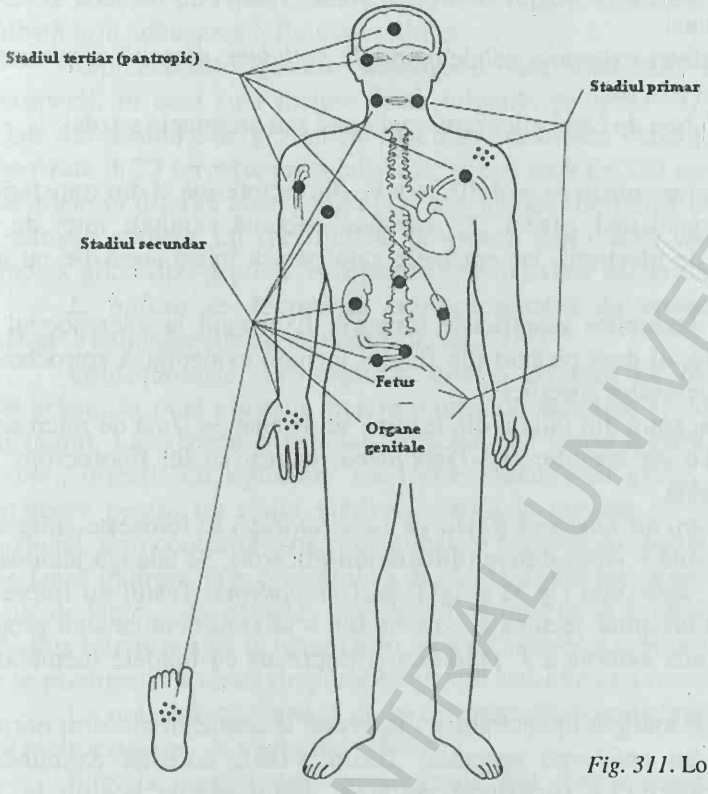


Fig. 311. Localizarea infecției cu *T. pallidum* (Baron, 1996).

Complicațiile neurologice sunt asociate cu sifilisul terțiar, dar *T. pallidum* pătrunde în SNC foarte timpuriu. Neurosifilisul este asociat totdeauna cu creșterea numărului de leucocite și a cantității de proteine în LCR. Uneori, în LCR se detectează agentul infecțios. Leziunea neurologică tipică, *tabes dorsalis*, apare la 20–30 de ani de la infecție și constă în degenerarea substanței albe a cordoanelor posterioare ale măduvei spinării și a ganglionilor rădăcinii dorsale.

Sifilisul se transmite la făt, în intervalul 10–15 săptămâni de sarcină. Rezultatul poate fi moartea fătului sau dacă nașterea este la termen, în copilărie apar semnele infecției: cheratită, anomalii ale SNC.

La pacienții HIV/SIDA, sifilisul provoacă șancruri multiple și extensive, cu evoluție rapidă spre neurosifilis.

Sifilisul pare a fi în primul rând o infecție invazivă. Cea mai mare parte a patologiei se datorează reacției inflamatorii indusă de agentul infecțios.

Evitarea răspunsului imun. Răspunsul imun este activat curând după infecție, înainte de stadiul clinic, contrar conceptului răspunsului imun "lent" în infecția cu *T. pallidum*. În stadiile primar și secundar se sintetizează IgM și IgG, cu rol opsonizant. Titrul IgM diminuează în stadiile tardive ale infecției și după tratament. IgM și IgG par să recunoască același grup de proteine de *Treponema*. Evoluția clinică foarte îndelungată a sifilisului se datorează capacității *T. pallidum* de a evita răspunsul

BCU "AUREL VLAICU" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

imun al gazdei. În maladia umană, dar şi în infecţia experimentală la animale, răspunsul imun local şi sistemic se elaborează în câteva săptămâni după infecţie şi determină eliminarea celor mai multe celule de *T. pallidum*. La 6 luni după infecţie, gazda dobândeşte aşa numita *imunitate de şancru*, adică nu mai face leziuni după reinfecţia cu *T. pallidum*. Rezistenţa este conferită fie de celulele T, fie de anticorpi.

Răspunsul imun al gazdei nu duce la eradicarea completă a infecţiei. Un număr mic de celule de *T. pallidum* viabile persistă intervale de timp de ordinul anilor în organele animalelor infectate experimental.

Mecanismele infecţiei latente pe termen lung nu se cunosc, dar agentul patogen se localizează în ţesuturi privilegiate imunitar (inaccesibile răspunsului imun): SNC, ochi, placentă, unde se multiplică lent. De aceea, tratamentul cu penicilină trebuie să fie de durată. Rata scăzută a diviziunii favorizează supravieţuirea, chiar în prezenţa efectorilor imunitari. În anumite localizări anatomice, factori locali neidentificaţi favorizează multiplicarea *T. pallidum* şi apariţia manifestărilor clinice. Alţi factori favorizanţi ai infecţiei latente sunt:

- antigenitatea slabă a suprafeţei externe a celulelor de *T. pallidum*, datorită conţinutului proteic scăzut al membranei externe;
- mascarea suprafeţei *T. pallidum* de către glicozaminoglicanii sau proteinele gazdei;
- localizarea intracelulară.

La *T. pallidum* funcţionează un mecanism de mobilizare a Fe din lactoferină şi din transferină, proteinele care sechestrează Fe în organismul gazdei. *T. pallidum* necesită cantităţi mici de Fe deoarece nu are catenă transportoare de electroni, iar enzimele sale par să înlocuiască Fe cu alte metale (Zn, Mg).

Diagnosticul se pune pe baza leziunilor superficiale timpurii. Examenul la microscopul cu fond întunecat, cu obiectivul de imersie, al unei picături din fluidul leziunii evidenţiază spirochetele mobile. În ser se identifică prezenţa anticorpilor specifici.

Testul imunofluorescenţei. O picătură din fluidul din leziune se depune pe lama de microscop şi se usucă la aer. Lama se acoperă cu ser specific anti-*Treponema*, marcat cu un fluorocrom. Se examinează la microscopul cu fluorescenţă.

În reacţia *serologică* VDRL (*Veneral Diseases Research Laboratories*) se foloseşte antigenul lipidic extras din ţesutul cardiac de bovine – *cardiolipina* (difosfatidil-glicerol). Se adaugă lecitina şi colesterolul pentru a stimula reacţia cu anticorpii (Ig M şi IgG) anti-*Treponema*. Testul nu foloseşte antigene de *T. pallidum*. Lipidele – cardiolipina, lecitina şi colesterolul – se consideră că sunt proprii gazdei, dar sunt încorporate în membrana externă a *T. pallidum* şi împreună cu lipidele membranei externe configurează tabloul antigenic.

Principiul reacţiei: particulele de antigen lipidic rămân dispersate la contactul cu serul normal dar floculează după ce se combină cu anticorpii specifici. Testul VDRL necesită examinarea microscopică pentru evidenţierea floculării. La persoanele netratate, testul devine pozitiv la 2-3 săptămâni după infecţie, are titru înalt în faza sifilisului secundar şi devine negativ la 6-18 luni după tratamentul eficient cu penicilină.

Testul cu antigen cardiolipinic dă uneori rezultate fals pozitive: anticorpii anti-cardiolipină sunt induşi de infecţia cu malarie, leproză, rujeolă, mononucleoză infecţioasă, LED, dezordini reumatice.

Testul imobilizării *T. pallidum* (TPI) constă în aceea că serul pacienţilor infectaţi inhibă mobilitatea agentului patogen, în prezenţa complementului activ din serul de cobai.

Testul imobilizării a fost înlocuit de testul *imunofluorescenţei indirecte*, care utilizează IgG de iepure anti-IgG umană pentru a evidenţia IgG legată de *T. pallidum*.

12.3.3. Genul Leptospira

Leptospirele sunt spirochete cu lungimea de 5-15 μm, fine, flexibile, spiralate helicoidal, cu turele de spiră strânse. Capetele celulei sunt rotunjite şi ambele sau numai unul se curbează şi formează structuri de forma unui cârlig, cu rol în perforarea ţesuturilor. Sunt mobile, cu mişcări "în tirbuşon", în profunzime şi deplasare limitată în spaţiu, ca rezultat al celor doi endoflageli inseraţi la extremităţile celulei, în spaţiul periplasmic. Leptospirele au două tipuri de mişcare: de translaţie (contracţie şi răsucire, cu deplasare) şi mişcarea de flexie-extensie (fără deplasare).

Ca şi alte spirochete, leptospirele au o membrană dublă: membrana citoplasmatică şi membrana externă, între care se găseşte peretele peptidoglicanic subţire. Componenta structurală a membranei este LPS, cu o compoziţie chimică asemănătoare LPS a bacteriilor Gram negative, dar activitatea toxică este inferioară.

Leptospirele sunt obligat aerobe, temperatura optimă de dezvoltare fiind 28–30°C. Sunt pozitive pentru testele catalazei şi oxidazei.

Leptospirele cresc pe medii simple, semisolide cu adaos de ser, B_2, B_{12}, în condiţii de aerobioză (sunt microaerofile). Ca sursă de C şi energie, oxidează numai acizii graşi cu catenă lungă de atomi de C, legaţi cu albumina, prin β-oxidare.

Leptospirele nu metabolizează glucidele sau aminoacizii, iar sursele de azot sunt sărurile de amoniu. Mediul cel mai utilizat conţine acid oleic-albumină serică bovină şi TWEEN 80. Unele tulpini necesită adaosul piruvatului sau a serului de iepure. Creşterea contaminanţilor din proba clinică este inhibată prin adăugarea 5-fluorouracilului.

Reprezentanţii genului *Leptospira* sunt distribuiţi în două specii: *L. interogans*, cu 8 genospecii, în care sunt incluse toate tulpinile patogene; *L. biflexa* cuprinde tulpinile saprobionte izolate din mediul extern. Ambele specii au numeroase variante antigenice (serologice). Tulpinile sunt repartizate în 23 serogrupuri subdivizate şi mai mult de 220 serovaruri. *L. interrogans* izolată de la om şi animale în diferite zone geografice este unitară din punct de vedere antigenic. Tulpinile izolate au un antigen somatic cu specificitate de gen şi dau reacţii serologice încrucişate. Antigenul este un complex glico-lipo-peptidic, echivalentul endotoxinei bacteriene.

L. biflexa se deosebeşte prin capacitatea de creştere în prezenţa 8-azaguaninei şi prin generarea celulelor sferice în mediu cu NaCl 1M.

Epidemiologie. Leptospiroza este o zoonoză cu distribuţie ubicvitară. Leptospirele sunt infecţioase, în mod obişnuit, pentru animalele sălbatice şi domestice, în special în tubii contorţi ai rinichiului. La şoarece şi şobolan, infecţia este foarte uşoară. La animalele domestice (câine, porc, bovine), infecţia cu leptospire are forme clinice mai grave, dar după însănătoşirea clinică, rămân purtătoare pentru tot restul vieţii şi constituie izvoare de infecţie pentru om. Omul este infectat ocazional, prin contactul direct cu animalele bolnave sau purtătoare sau cu excretele acestora. Omul se infectează indirect, prin contactul cu gazda de menţinere (şoarece, şobolan, iar pentru unele serotipuri, vacile de lapte, oaia, câinele), care transferă infecţia la animalele domestice (câine) şi la om. Agentul infecţios este propagat în natură prin infecţia cronică a tubilor renali ai gazdelor de menţinere. Infecţia lor se produce la o vârstă timpurie şi agentul este eliminat cronic.

La om, infecţia variază de la cea inaparentă (subclinică), până la sindromul sever al infecţiei mai multor organe, cu mortalitate înaltă.

Infecţia omului este ocupaţională sau recreaţională şi se datorează deversării agentului infecţios din urina animalelor purtătoare de leptospire, în mediul acvatic. Incidenţa este semnificativ mai mare în zonele calde, deoarece *Leptospira* îşi păstrează mai bine viabilitatea în mediul cald şi umed. Inhalarea aerosolilor contaminaţi poate duce la infecţia pe calea mucoasei tractului respirator. Leptospira rămâne viabilă în apele stagnante pentru câteva săptămâni. Consumul apei şi alimentelor contaminate, scăldatul favorizează transmiterea la om. Copiii se infectează mai frecvent de la câini. Contactul direct cu animalele infectate explică infecţiile fermierilor, veterinarilor, lucrătorilor din abator. Rareori, infecţia se datorează muşcăturii animalelor.

Agentul patogen pătrunde prin leziunile tegumentare, sau chiar prin tegumentul intact expus un timp îndelungat umidităţii, prin mucoasa orală sau prin conjunctivă. Ingestia ca rută de infecţie este de importanţă secundară.

Contactul indirect cu agentul patogen constituie un risc de infecţie pentru lucrătorii din mediile acvatice (orezării, exploatările de trestie de zahăr).

Patologie. Marea majoritate a infecţiilor cu *L. biflexa* sunt fie subclinice, fie sunt forme uşoare, fără să necesite asistenţă medicală. O proporţie mică dintre ce infectaţi fac febră bruscă, asociată cu alte simptome: dureri de cap, frisoane, mialgie, mai rar erupţie tegumentară. Aceasta este faza de bacteriemie. Sindromul anicteric durează circa o săptămână. Dispariţia simptomelor coincide cu sinteza anticorpilor.

Din sânge, *Leptospira* trece în organele interne, în special în ficat, unde poate determina manifestări severe, cu icter, dar şi în meninge, plămân, miocard, globul ocular. Leptospiroza icterică este o formă severă de infecţie. Icterul nu este asociat cu necroza hepatocitelor, iar după vindecare, funcţia hepatică revine la normal.

După circa 8 zile de la infecţie, *Leptospira* se localizează în tubii contorţi ai rinichiului şi determină insuficienţa renală acută.

Leziunile histopatologice se evidenţiază în ficat, rinichi, cord, plămân (fig. 312). În rinichi, nefrita interstiţială este asociată cu infiltratul intens al neutrofilelor şi monocitelor. Bordura în perie a celulelor tubulare este dezorganizată, cu scăderea numărului de mitocondrii. Leziunile hepatice sunt nesemnificative, dar poate apărea colestaza intrahepatică. Hiperplazia celulelor Kupffer este evidentă, chiar cu eritrofagocitoză. În muşchii striaţi ai piciorului poate să apară necroza focală a fibrelor musculare.

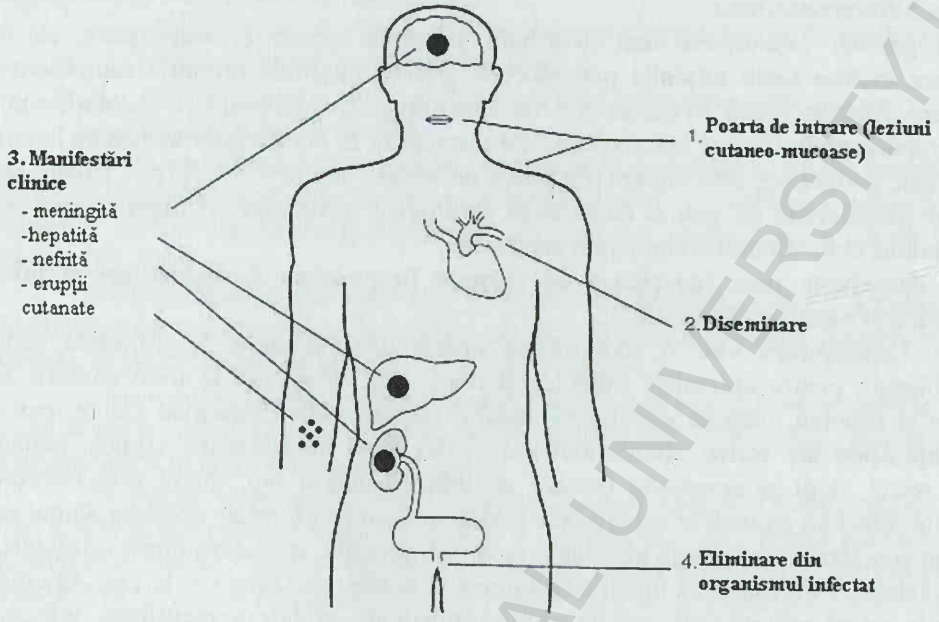


Fig. 312. Localizarea leptospirozei (Baron, 2006).

Patogeneza. Mecanismele prin care *L. biflexa* produce starea de boală nu sunt cunoscute. LPS are activitate endotoxică uşoară şi ar putea să medieze procesul patologic, cel puţin la variantele antigenice cu virulenţă mai mare. Leptospira aderă, *in vitro*, la celulele epiteliului renal. Aderenţa este stimulată de concentraţia subaglutinantă a anticorpilor specifici. Macrofagele fagocitează celulele de *Leptospira* opsonizate cu anticorpi. Neutrofilele nu omoară agentul infecţios.

În stadiul al doilea al infecţiei (stadiul imun), are loc sinteza anticorpilor, care coincide cu dispariţia celulelor de *Leptospira* din sânge şi a simptomelor. Severitatea maladiei nu se corelează cu gradul leziunilor tisulare, ci cu cantitatea de complexe imune circulante.

LPS este foarte imunogen şi determină specificitatea serologică a diferitelor variante antigenice. *In vitro*, anticorpii se evidenţiază în reacţia de aglutinare cu celule de *Leptospira* vii sau omorâte sau în reacţia de fixare a complementului.

Imunitatea este predominant humorală, mediată de anticorpii specifici anti-LPS, iar IMC este represată, fapt care se reflectă în diminuarea numărului de limfocite TCD_4 şi în capacitatea de răspuns la mitogeni.

Diagnosticul. Evidenţierea microscopică (la microscopul cu fond întunecat, prin metoda imunofluorescenţei sau la microscopul cu fond clar după colorare) în probe are avantajul rapidităţii (fig. 313).

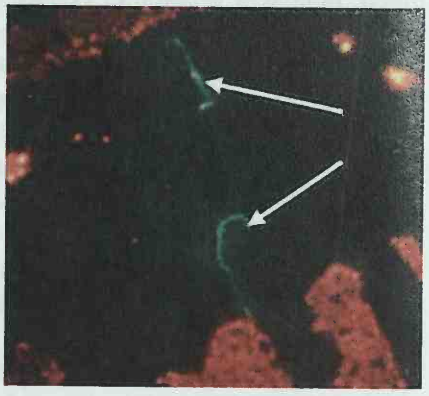


Fig. 313. L. interrogans în urină evidenţiată prin metoda imunofluorescenţei (Hornsby citat de Zuerner, 2006).

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sângele recoltat cu heparină, LCR sau țesuturile se folosesc pentru prepararea frotiurilor care se colorează Giemsa. Examenul urinii la microscopul cu fond întunecat oferă rezultate concludente. Este necesară o densitate de circa 10^4 celule de *Leptospira*/ml pentru ca o celulă să fie vizibilă în câmpul microscopului cu fond întunecat.

Detectarea antigenelor de *Leptospira* prin metoda RIA sau ELISA în proba clinică are o specificitate mai înaltă decât microscopia cu fond întunecat.

Diagnosticul serologic se foloseşte cu cea mai mare frecvență: anticorpii se detectează în ser la 5–7 zile după declanşarea simptomelor. Antigenele de *Leptospira* pot avea specificitate de gen sau de grup. Anticorpii produc aglutinarea celulelor de *Leptospira* în mediu lichid, detectabilă la microscop.

Izolarea. Leptospira apare în sânge, în primul stadiu al infecției, înainte de declanşarea simptomelor şi dispare la sfârşitul primei săptămâni a stadiului acut. Cultivarea probei de sânge trebuie să se facă cât mai repede: 1–2 picături de sânge se inoculează în 10 ml de mediu semisolid, cu adaos de 5-fluorouracil. În prima săptămână, *Leptospira* se poate izola din LCR. Proba de urină se poate cultiva la începutul săptămânii a II-a a bolii simptomatice, deoarece durata excreției urinare poate dura câteva săptămâni. *Leptospira* supraviețuieşte un interval limitat în urină şi de aceea se impune prelucrarea rapidă a probei: centrifugarea, resuspendarea sedimentului în TFS şi inocularea. Incubarea se face la 28–30°C.

Creşterea este lentă şi necesită examinarea săptămânală la microscopul cu fond negru, timp de circa 13 săptămâni. Tratamentul se realizează cu peniciline sau tetracicline (doxiciclină, minociclină).

Spirochetele din cavitatea bucală (*Borrelia bucalis*) sau cele care populează organele genitale (*B. refringens*) sunt saprobionte, strict anaerobe.

Spirillum minor produce febra muşcăturii de şobolan (febra Sodoku). Agentul patogen este inoculat prin muşcătura de şobolan şi produce adenopatie regională, erupție eritematoasă tegumentară şi febră recurentă.

Bibliografie selectivă

1. Buck G. E. 1990. *Campylobacter pylori* and gastroduodenal disease. Clin. Microbiol. Rev. 3: 1–12.
2. Brooks G. F., Caroll K.C., Butel J.S., Morse S.A. 2007. Jawets, Melnick & Adelberg Medical Microbiology, 24th Edition, Mc Graw Hill – Lange International Edition.
3. Primm T. 2002. Cholera Toxin Mechanism of Action. ASM microbelibrary.org
4. EFSA. 2010. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on Quantification of the risk posed by broiler meat to human campylobacteriosis in the EU. EFSA Journal. 2010; 8:1437. 89 pp.
5. Euzéby, J. P. 2010. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Campylobacter. http://www.bacdico.net
6. FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations and the World Health Organization]. 2009. Salmonella and Campylobacter in chicken meat: meeting report. Microbiological Risk Assessment Series No. 19. Rome. May 2009. 69pp.
7. Moore J. E., Deborah Corcoran, Dooley J. S. G., Fanning S., Brigid Lucey, Matsuda M., McDowell D. A., Mégraud F., Millar B. C., Rebecca O'Mmahony, Lisa O'Riordan, Michele O' Rourke, Rao J. R., Rooney P. J., Sails A., Whyte P. *Campylobacter*. Vet. Res. 2005; 36: 351–382.
8. Ng L-K, Sherburne R, Taylor DE, Stiles ME. 1985. Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. J Bacteriol. 164:338–343.
9. Peek R. M., Jr., Blaser M. J. 2002. H*elicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. Nature Reviews Cancer 2: 28–37.
10. Alam M. 2009. Serogroup, Virulence, and Genetic Traits of *Vibrio parahaemolyticus* in the Estuarine Ecosystem of Bangladesh. Appl. Environ. Microbiol. 75(19): 6268–6274
11. Burdette D. L. et al. 2008. *Vibrio parahaemolyticus* orchestrates a multifaceted host cell infection by induction of autophagy, cell rounding, and then cell lysis. PNAS. 105(34): 12497–12502
12. Burdette D. L., Yarbrough M. L., Orth K. 2009. Not without cause: *Vibrio parahaemolyticus* induces acute autophagy and cell death. NIH Public Access 5(1): 100–102
13. Bates T. C., Oliver J. D. 2004. The Viable But Nonculturable State of Kanagawa Positive and Negative Strains of *Vibrio parahaemolyticus*. J. Microbiol. 2004, 42(2):74–79
14. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Parts A–C
15. Charles A., Janeway Jr, Paul Travers, Mark Walport, Mark J. Shomchik. 2005. Immunobiology, 6th edition, Garland Science Publishing.
16. Cummings R. D., Esko J. D. 2009. Principles of Glycan Recognition. 2nd Edition. Essential of Glycobiology. CSH press
17. Spangler D. 1992. Structure and Function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. Microbiol. Rev.56(4) : 662–647.

18. Del Giudice G., Covacci A., Telford J. L., Montecucco C., Rappuoli R. 2000. The Design Vaccines against *Helicobacter pylori* and their Development - Annu. Rev. Immunol. 19: 523–563.
19. Dunn B. E., Cohen H., Blaser M. J. 1997. *Helicobacter pylori* Clin. Microbiol. Rev.10: 720–741.
20. Edited by: Garrity, George M.; Brenner, Don J.; Krieg, Noel R.; Staley, James R. © 2005 Springer – Verlag
21. Fabbri A et al. 1999. *Vibrio parahaemolyticus* Thermostable Direct Hemolysin Modulates Cytoskeletal Organization and Calcium Homeostasis in Intestinal Cultured Cells. Infection and Immunity 67(3): 1139–1148
22. Harrison's Principles of Internal Medicine, 17ed. Updates. 2000: Therapy of *Helicobacter pylori*: Current Status and Issues
23. Wassernaar T. M. 1997. Toxin Production by Campylobacter spp. Clin. Microbiol. Rev. 10: 466–476.
24. Yeung P. S. M., Boor K. J. 2004. Epidemiology, Pathogenesis, and Prevention of Foodborne *Vibrio parahaemolyticus*. Infections, Foodborne Pathogens and Disease 2004, 1(2): 74–88
25. Nair B. G. et al. 2007. Global Dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* Serotype O3:K6 and Its Serovariants. Clin. Microbiol. Rev. 20(1):39–48
26. Aguero-Rosenfeld M. E., Wang G., Schwartz I., Wormser G. P. 2005. Diagnosis of Lyme Borreliosis - Clin. Microbiol. Rev. 18: 484–509.
27. Baron S., editor. Medical Microbiology. 4th edition. 1996.
28. Baughn R. E. Musher, D. M. 2005.Secondary Syphilitic Lesions Clin. Microbiol. Rev. 18: 205–216.
29. Brooks G. F., Caroll K. C., Butel J. S., Morse S. A. – Jawets, Melnick & Adelberg Medical Microbiology. 2007. 24th Edition, Mc Graw Hill – Lange International Edition.
30. Burgdorfer Willy. 12th International Conference on Lyme Disease and Other Spirochetal and Tick-Borne Disorders, 1 – April 9, 1999. Keynote Address – The Complexity of Vector-borne Spirochetes (*Borrelia* spp).
31. Connolly S. E., Benach J. L. 2005. The versatile roles of antibodies in *Borrelia* infections. Nature Reviews Microbiology 3, 411–420
32. http://biosink.blogspot.com/2008_05_18_archive.html
33. La Fond R. E., Lukehart S. A. 2006. Biological Basis for Syphilis Clin. Microbiol. Rev. 19: 29–49.
34. Levett P. N. 2001. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 14: 296–326.
35. Norris S. J. 1993. Polypeptides of *Treponema pallidum*: progress toward understanding their structural, functional, and immunologic roles. Treponema Pallidum Polypeptide Research Group – Microbiol. Rev. 57(3): 750–779.
36. Schell R. F., Callister S. M. 1999. Borrelia, Infection and Immunity in vol. Encyclopedia of Immunology. Ed. Peter Delves, Ivan M. Roitt, AP.
37. Schultz C. P., Wolf V., Lange R., Mertens E., Wecke J., Naumann D., Zahringer U. 1998. Evidence for a New Type of Outer Membrane Lipid in Oral Spirochete *Treponema denticola,* FUNCTIONING PERMEATION BARRIER WITHOUT LIPOPOLYSACCHARIDES. The Journal of Biological Chemistry, 273, 15661–15666.
38. Schwan T. G., Piesman J. 2002. Vector Interactions and Molecular Adaptations of Lyme Disease and Relapsing Fever Spirochetes Associated with Transmission by Ticks Perspective 8, No. 2
39. Sigal L. H. 1997. Lyme Disease: A review of Aspects of Its Immunology and Immunopathogenesis – Annu. Rev. Immunol. 15: 63–92.
40. Szczepanski A., Benach J. L. 1991. Lyme borreliosis: host responses to *Borrelia burgdorferi* – Microbiol. Rev. 55(1): 21–34.
41. www.metapathogen.com
42. Zuerner R.L. 2006. Laboratory Maintenance of Pathogenic Leptospira. Current Protocols in Microbiology February, http://www.currentprotocols.com/protocol/mc12e01
43. Sigal L. 1997. Lyme Disease: A review of Aspects of Its Immunology and Immunopathogenesis. Annu. Rev. Immunol.15: 63–92.
44. Szczepanski A., Benach J. L. 1991. Lyme borreliosis: host responses to *Borrelia burgdorferi*. Microbiol. Rev. 55(1): 21–34.
45. Aguero-Rosenfeld M. E., Wang G., Schwartz I., Wormser G.P. 2005. Diagnosis of Lyme Borreliosis. Clin. Microbiol. Rev. 18: 484–509.
46. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:H_pylori_ulcer_diagram.png
47. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:H_pylori_virulence_factors_en.png
48. http://www.diasource-diagnostics.com/en/Products/Rapid-Tests/Gastrointestinal-Metabolism/Helicobacter-Pylori-Hpylori/Hpylori-Card-20-tests
49. http://www.tjclarkinc.com/bacterial_diseases/cholera_vibrio_cholerae.htm
50. *Mégraud F., Lehours P. 2007.* Helicobacter pylori *Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical Microbiology Reviews. 20, 2: 280–322*
51. Olson T. R., Pawlina W. 2008. A.D.A.M. Student Atlas of Anatomy. 2nd Edition.

BCU IAȘI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

13. BACTERII INTRACELULARE

Din punct de vedere imunologic, infecțiile produse de bacteriile intracelulare prezintă câteva particularități:

1. protecția față de bacteriile intracelulare este mediată de limfocitele T. Acestea nu interacționează direct cu agentul patogen, ci cu suprafața celulei infectate. Anticorpii au importanță nesemnificativă ca efectori ai protecției imunitare față de infecțiile intracelulare;
2. infecțiile produse de bacteriile intracelulare sunt însoțite de reacția de hipersensibilitate întârziată, care se manifestă după administrarea locală a antigenelor solubile, ca o reacție mediată de celulele T, ai cărei efectori sunt macrofagele;
3. reacțiile tisulare anti-bacterii intracelulare sunt *granulomatoase*. Atât reacțiile protectoare, cât și patologia sunt cauzate de granuloame. Ruperea granulomului favorizează diseminarea agentului patogen și extinderea leziunilor;
4. bacteriile intracelulare exprimă puțin sau de loc potențial toxic pentru celula gazdă, iar patologia este consecința activării răspunsului imun, mediat în primul rând, de limfocitele T. În contrast, bacteriile extracelulare secretă toxine, unele extrem de potente, care produc leziuni tisulare directe;
5. bacteriile intracelulare sunt bine adaptate: ele coexistă perioade lungi cu celula gazdă. Între infecția persistentă și imunitatea protectoare se dezvoltă un echilibru, rezultatul fiind o perioadă lungă de incubație și un proces infecțios cronic. Infecția este distinctă de procesul patologic. În contrast, bacteriile extracelulare produc infecții acute, care se declanșează curând după infecție și se încheie după ce răspunsul imun atinge o intensitate optimă.

Unele bacterii patogene sunt facultativ intracelulare, parcurgând în cursul ciclului infecțios o fază intracelulară, fără însă a fi strict dependente de mediul celular: *M. tuberculosis, M. bovis, M. leprae, S. enterica, Brucella* sp., *L. monocytogenes, Francisella tularensis*. Ele infectează în primul rând monocitul, dar și alte celule: de exemplu, *M. leprae* infectează celulele Schwann, iar *L. monocytogenes* infectează hepatocitele. Bacteriile parazite obligat intracelulare (*Chlamydia, Rickettsia*) nu supraviețuiesc în mediul extracelular al gazdei. Ele infectează celulele endoteliale și epiteliale, dar și monocitele.

Mecanismele invaziei. După aderență, invazia este produsă pe două căi: a) prin mecanismul ''fermoarului''; receptorii celulei gazdă semnalează aderența și induc modificările citoscheletului, în special ale filamentelor de actină, al căror rezultat este înglobarea bacteriei; de exemplu, intrarea *L. monocytogenes* în epiteliul intestinal este mediată de internalina bacteriană și de caderina E de pe suprafața celulelor epiteliale umane; b) înglobarea independentă de moleculele membranare ce mediază aderența. Interacția bacteriei cu membrana celulei gazdă produce intruzia localizată (*ruffling*), urmată de endocitoză. Pe această cale sunt endocitate nediscriminatoriu particulele aderente. Procesul a fost denumit macropinocitoză.

Fagocitele profesioniste exprimă receptori membranari pentru structurile conservate ale patogenilor microbieni, denumite *pathogen associated microbial pattern* (PAMP), care lipsesc de pe celulele mamaliene. Spectrul larg al agenților patogeni microbieni este recunoscut de un număr limitat de molecule receptoare ale gazdei (*pathogen recognition receptors* = PRR), care aparțin următoarelor grupe:

- *receptorii familiei TLR* (*Toll-like receptors*) recunosc structurile distincte ale microorganismelor: glicoproteine, lipoproteine, proteine de șoc termic, proteine flagelare;

- receptorii de tip *lectinic* cu specificitate pentru glucidele comune exprimate pe suprafața bacteriilor: a) receptorii pentru *manoză* (MBL) recunosc și alte glucide: N-acetilglucozamina, glucoza și L-fucoza; b) receptorii pentru *galactoză* recunosc N-acetilgalactozamina și galactoza; c) receptorii pentru *fucoză*;
- molecule membranare speciale: CD_{14}, cu specificitate pentru glicolipide (LPS) și pentru lipoarabinomananul (LAM) micobacteriilor.

Mecanisme de supraviețuire a bacteriilor patogene în celula gazdă

Majoritatea bacteriilor, inclusiv multe bacterii patogene, după ce sunt fagocitate de macrofage sau de neutrofile (PMNN) sunt omorâte. Unele bacterii patogene au elaborat strategii, care le permit să supraviețuiască și să se multiplice în interiorul fagocitelor. *Sh. flexneri, L. monocytogenes* și rickettsiile dizolvă vacuola inițială, de origine membranară și astfel dobândesc acces la citoplasma bogată în substanțe nutritive. *Salmonella sp., Mycobacterium sp.* și *Legionella* sp. evită sau inhibă fuziunea fagosomului cu lizosomii.

Majoritatea bacteriilor patogene internalizate sau fagocitate în vacuole ramân incluse în aceste structuri pe durata vieții intracelulare. Ele și-au elaborat strategii pentru anihilarea mecanismelor celulei gazdă destinate să omoare agentul invadant.

Factorii de virulență care determină rezistența la enzimele lizosomale și măresc capacitatea de supraviețuire intracelulară sunt:

- învelișul protector la suprafața celulei (capsula, LPS);
- enzimele bacteriene care neutralizează radicalii toxici ai O_2 și enzimele proteolitice care degradează enzimele lizosomale ale gazdei.

Motilitatea intracelulară dependentă de actină

Toate celulele pot forma diferite tipuri de pseudopode și intruzii ale membranei celulare, ca răspuns la stimulii externi: PMN, monocitele, macrofagele și celulele metastazante se deplasează ușor prin țesuturi. Mișcările lor sunt mediate de citoscheletul de actină.

Bacteriile patogene *L. monocytogenes, Shigella sp., Rickettsia* sp. posedă mecanisme prin care induc rearanjări ale citoscheletului celulei gazdă pentru a genera propria mobilitate. Aceste bacterii induc condensarea la una dintre extremitățile lor, a filamentelor scurte de actină celulară și a altor proteine ale citoscheletului. Se formează astfel o structură în creștere continuă, care propulsează celula bacteriană în citoplasma celulei gazdă și în celulele adiacente. Citoscheletul de actină este dinamic, unii monomeri se condensează, iar alții se disociază, furnizând forța motrice care permite celulei gazdă să adopte forme diferite și să asigure deplasarea orientată a celulei bacteriene.

Bacteriile intracelulare invadează celulele adiacente pe calea unor protruzii digitiforme proeminente la suprafața celulei infectate, care se formează când bacteria propulsată de apendicele de actină exercită o presiune pe fața internă a membranei citoplasmatice. În interiorul protruziei, polul bacterian opus direcției de deplasare este ocupat de "coada" de actină, de forma unui cilindru gol. Protruzia delimitată de membrană, care conține bacteria, cu o lungime de 20 µm, penetrează suprafața membranei în celula adiacentă și este înglobată prin fagocitoză. Ulterior, bacteria lizează membrana și se eliberează în citoplasma celulei adiacente. Cele mai multe protruzii conțin o celulă bacteriană în curs de diviziune sau chiar două bacterii (fig. 241).

Motilitatea mediată de actină este un factor esențial al virulenței pentru *L. monocytogenes* și *Shigella sp.*: deleția sau inactivarea genelor ce codifică proteinele care determină polimerizarea actinei atenuează virulența. După ce *L. monocytogenes* intră în celulă sau după plasarea în extractele citoplasmatice, asocierea cu actina are aspectul inițial al unui ''nor'' de actină filamentoasă care înconjoară bacteria. Norul evoluează într-o coadă de actină, care se extinde exclusiv de la un pol al bacteriei. Lungimea cozii este reglată de alte proteine: *cofilina* depolimerizează actina. Experiențele la voluntari umani și la maimuțe au arătat că mutantele de *Shigella* care nu asamblează apendicele de actină au o virulență mult mai atenuată, ceea ce evidențiază rolul motilității prin mecanismul condensării actinei pentru patogeneză. În celulele infectate, *Shigella* se deplasează cu rate de 5,4–26 µm/minut, asemănătoare cu rata deplasării *Listeria*. Apendicele format de *Shigella* este asemănător morfologic cu cel format de *Listeria*: are o lungime de 7µm și lățimea de 0,7 µm. Filamentele de

actină sunt uniforme (0,1 μm), reunite într-o rețea ramificată. Diferența față de *Listeria* constă în faptul că filamentele de actină sunt limitate la polul celulei și lipsesc pe laturile bacilului. Asamblarea cozii de actină este mediată de proteina IcsA (virG). Deleția genei codificatoare a proteinei IcsA duce la pierderea capacității de a asambla apendicele de actină. Proteina de 1102 aminoacizi (110 kDa), ancorată în membrana externă prin domeniul β-COOH terminal, este necesară și suficientă pentru asamblarea apendicelui de actină. Aproximativ 750 de aminoacizi ai domeniului α sunt expuși la suprafața celulei. După ce este inserată în membrana externă a polului celular vechi, proteina IcsA difuzează în zonele laterale ale bacilului. Domeniul α al proteinei IcsA, expus la suprafața celulei, conține toate regiunile necesare pentru asamblarea actinei. Proteina este localizată predominant la polul vechi al celulei. Când celula intră în diviziune, proteina IcsA începe să se exprime și pe celălalt pol. Apendicele de actină se asamblează pe polul celular la care IcsA are cea mai mare densitate.

Rickettsia sp. este un cocobacil Gram negativ, parazit obligat. Toți membrii grupului au capacitatea de a condensa apendicele de actină, prin intermediul căruia dobândesc mobilitate intracelulară. *Rickettsia* părăsește vacuola de endocitoză după circa 15 minute. În citoplasmă, în jurul celulei, se polimerizează un "nor" de actină, care se organizează într-un apendice la un pol al bacteriei. *Rickettsia* formează protruzii ale membranei celulei gazdă, prin intermediul cărora se disemnează în celulele proximale. Apendicele de actină este format din filamente mai lungi (0,3–3 μm), așezate paralel. În celulele mamaliene, *in vitro*, *Rickettsia* se deplasează cu rate de 4,8–8 μm/min, de două ori mai mică decât rata deplasării *Listeria* și *Shigella*. Spre deosebire de *Listeria* și *Shigella*, *Rickettsia* invadează nucleul și se multiplică. În nucleu, celulele bacteriene asamblează cozi de actină.

13.1. Chlamidii

Chlamidiile sunt bacterii Gram negative, parazite obligat cu localizare intracelulară, la o largă varietate de gazde. Speciile infecțioase pentru om sunt: *Chl. psittaci, Chl. trachomatis* (biovar lymphogranuloma venereum – LGV și trachoma) și *Chl. pneumoniae*. Diferențierea se face pe baza compoziției antigenice, a sensibilității la sulfonamide și a patogenezei. *Chl. pecorum* este infecțioasă pentru animale, dar nu pentru om.

Chlamidiile au morfologie asemănătoare și un ciclu comun de dezvoltare. Adaptându-se la existența intracelulară, chlamidiile au pierdut sistemul propriu producător de energie și nu produc ATP, dar au păstrat principalele activități metabolice: glicoliza, respirația, biosinteza pentozelor. Dezvoltarea intracelulară a chlamidiilor depinde de ATP și de alți compuși cu energie înaltă obținuți din celula gazdă. Chlamidiile au aparatul enzimatic necesar sintezei ADN, ARN și a proteinelor, dar preiau numeroși precursori din celula gazdă (nucleotide, aminoacizi, nutrienți, vitamine, diferiți cofactori) (Madigan și colab., 1997).

C. psittaci este parazită în special la păsări și mamifere neumane, dar pot fi infectate și vertebratele cu sânge rece, nevetebratele sau chiar omul.

C. trachomatis este parazită la șoarece și la om.

La mamifere și la păsări, ambele specii produc infecții ale conjunctivei oculare, tractului urogenital și respirator, ale tractului digestiv și probabil cu alte localizări (Barnes, 1990).

În ceea ce privește structura, s-au identificat 2 tipuri celulare chlamidiale:

- *corpul elementar*
- *corpul reticulat.*

Alternarea celor 2 tipuri celulare constituie ciclul de dezvoltare a chlamidiilor. Cele două forme distincte morfologic – corpul elementar și corpul reticulat – sunt adaptările la existența în mediul extracelular și respectiv, intracelular.

Particula infecțioasă stabilă în mediu este o celulă mică, denumită *corp elementar*, cu diametrul de 0,3 μm, cu o zonă centrală electronodensă, delimitat de peretele celular. Peretele celular al chlamidiilor se aseamănă cu peretele celular al bacteriilor Gram negative, cu conținut crescut de lipide, dar nu conține peptidoglican (fig. 314).

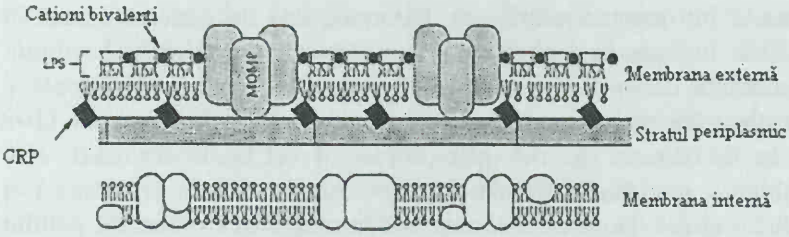


Fig. 314. Structura peretelui celular la *Chlamydia* (MOMP – proteina majoră a membranei extene; CRP – proteine bogate în cisteină) (Hatch, 1996).

Componentele analoge pentapeptidelor pot fi prezente, deoarece creşterea şi diviziunea lor este alterată în prezența antibioticelor β-lactamice.

Corpul reticulat conține de 4 ori mai mult ARN decât ADN, iar în corpul elementar proporția ARN/ADN este echilibrată. ADN este localizat în structura centrală electronodensă, iar ARN în ribosomi.

Chlamidiile au proprietăți tinctoriale asemănătoare cu ale rickettsiilor: se colorează cu Giemsa, în contrast cu nuanța albastră a citoplasmei celulei gazdă.

Ciclul de dezvoltare este bifazic, cu o formă extracelulară inactivă (latentă) şi o fază intracelulară care se multiplică. Stadiul de creştere şi multiplicare a chlamidiilor este obligat intracelular. Ele pătrund în celula gazdă, se multiplică şi se disemineză în mediul extracelular. Pentru a parcurge aceste etape, chlamidiile parcurg un ciclu de dezvoltare care cuprinde forme cu morfologie şi funcții alternante.

Forma infecțioasă a chlamidiilor este *corpul elementar* (CE), ce se fixează pe membrana celulei țintă şi inițiază pătrunderea. Corpul elementar are dimensiuni mici, este dens, cu perete celular rigid, conferit de legăturile multiple S-S ale proteinei majore a membranei externe şi a altor 2 proteine bogate în cisteină: proteina de înveliş (60 kDa) şi o lipoproteină a membranei externe (12 kDa).

Corpul elementar este rezistent la factorii de mediu, favorizând supraviețuirea în mediul extracelular, după liza celulei gazdă şi trecerea de la o celulă la alta şi de la o gazdă la alta.

Corpul elementar nu se divide, este inert din punct de vedere metabolic, dar are afinitate înaltă pentru celulele epiteliale. Rolul său este de a propaga infecția de la o celulă la alta. Membrana conține heparan-sulfat (un proteoglican), cu funcție de ligand, prin intermediul căruia corpul elementar se ataşează la baza microvililor şi este înglobat în vezicule tapetate cu clatrină, prin endocitoză mediată de receptori.

Intrarea în celulă este mediată de vezicula de fagocitoză derivată din membrana citoplasmatică a celulei gazdă. Chlamidiile rămân în vacuola neacidă în tot ciclul intracelular şi evită fuziunea cu lizosomii. Vacuola rămâne o structură distinctă față de căile de endocitoză şi exocitoză ale celulei, dar se pare că agentul infecțios exportă proteine care sunt încorporate în membrana vacuolei. În interiorul vacuolei mari, chlamidiile se redistribuie, de la periferia celulei spre zona perinucleară, printr-un mecanism dependent de actina F.

Fuziunea lizosomilor cu vacuola de fagocitoză este inhibată prin mecanisme necunoscute. În celulă, corpul elementar suferă schimbări morfologice şi se reorganizează în *corpul reticulat (CR)*, mai mare, activ metabolic, care se divide repetat prin fisiune binară, în endosomul care se extinde în citoplasmă şi devine vizibil ca o microcolonie, cunoscută ca *incluzie chlamidiană*. Corpii reticulați sunt structuri mai puțin rigide, care nu supraviețuiesc în mediul extracelular şi nu infectează celule noi.

Corpul elementar infecțios este convertit în corpul reticulat, prin alterarea structurii membranei externe datorită clivajului reducător al legăturilor S-S dintre proteina majoră a membranei externe şi alte proteine ale membranei externe. Reducerea legăturilor S-S duce la fluiditatea crescută a membranei, creşterea permeabilității, transportul nutrienților din celula gazdă şi reluarea activității metabolice. Absența legăturilor S-S din structura membranei explică fragilitatea osmotică şi mecanică a corpului reticulat chlamidial.

După o perioadă de creştere şi diviziune, corpul reticulat se reorganizează, se condensează şi formează numeroşi corpi elementari, infecțioşi. Ciclul de dezvoltare este complet, odată cu liza celulei gazdă sau când corpii elementari sunt exocitați şi inițiază un nou ciclul infecțios (fig. 315).

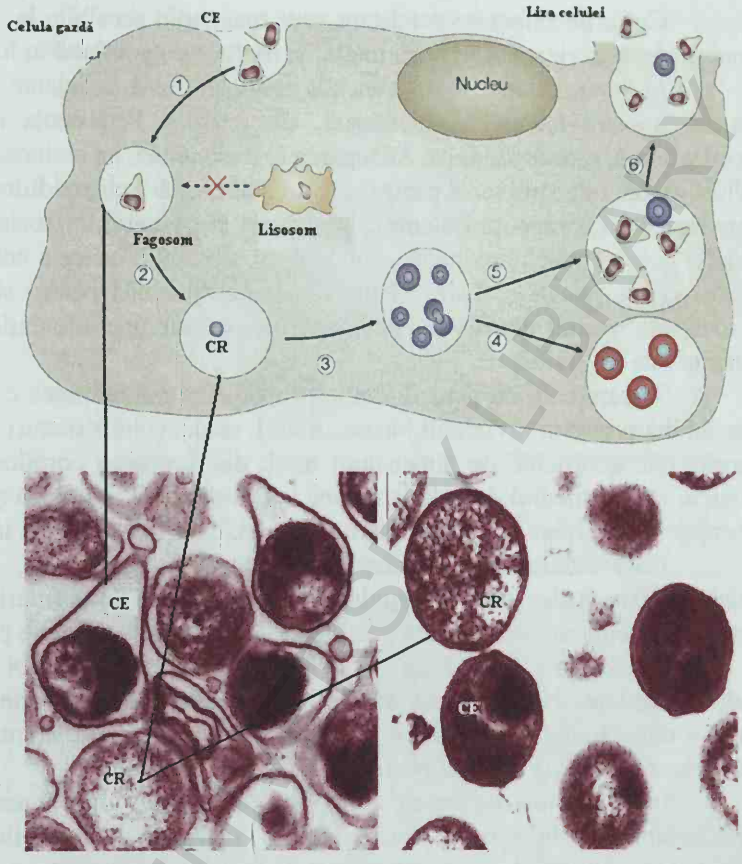


Fig. 315. Ciclul de viață la *Chl. pneumoniae* (Campbell și Kuo, 2004).

Durata ciclului complet de dezvoltare, studiat în culturi celulare, este de 47–72 de ore și variază în funcție de tulpină, de celula gazdă și de condițiile de mediu.

Intrarea *Chl. psittaci* și *Chl. trachomatis* în fagocitele profesioniste și neprofesioniste se face prin același mecanism și este independentă de energie. Incluziile intracelulare asociate multiplicării *Chl. trachomatis* conțin glicogen, spre deosebire de cele produse de *Chl. psittaci*.

Patologie. Chl. trachomatis biovar *trachoma* infectează exclusiv celulele epiteliale squamoase columnare ale conjunctivei, tractului genital și respirator, constituind cauza majoră a infecțiilor cu transmitere sexuală pe tot globul și a orbirii infecțioase (trachoma) în țările nedezvoltate.

Chlamidiile pot produce infecții ale tractului respirator și sunt asociate cu ateroscleroza.

Trachoma este o maladie oculară, o keratoconjunctivită cronică, ce debutează cu inflamația acută a conjunctivei și corneii și progresează la desprinderea corneei și orbire. În ariile endemice, infecția are loc în copilărie, iar consecința pe termen lung – trachoma – se instalează lent. La bărbați, *Chl. trachomatis* produce uretrită negonococică.

Procesul patologic datorat infecției chlamidiale pare a fi mediat de *reactivitatea imunitară*. Răspunsul imun al gazdei stimulat de episoadele repetate ale infecției amplifică leziunile patologice. Reinfecția sau persistența în stare inaparentă a unei forme modificate a chlamidiei determină modificările patologice.

Persistența infecției chlamidiene s-a evidențiat în diferite culturi celulare, fiind asociată cu modificarea modului de dezvoltare a chlamidiilor, care rămân viabile, dar se opresc temporar într-un stadiu neproductiv al ciclului de creștere, ceea ce sugerează capacitatea înnăscută a chlamidiilor de a persista intracelular, fapt care ar reprezenta modalitatea de inducere a procesului patologic. Factorii care favorizează persistența sunt necunoscuți.

Chlamidiile, ca și ceilalți patogeni intracelulari, eludează mecanismele de apărare ale celulei gazdă. Chlamidiile endocitate sunt sechestrate în fagosomul derivat din membrana celulei gazdă. Evenimentul esențial care permite supraviețuirea agentului infecțios în celula gazdă este inhibiția fuziunii fagosomului cu lizosomii.

Culturile infectate persistent sunt mai puțin sensibile la rifampină şi clortetraciclină, ceea ce denotă că transcrierea ADN chlamidial şi traducerea continuă în formele persistente.

In vitro, chlamidiile pot invada celulele gazdă deficiente în substanțe nutritive şi după intrare rămân în stare latentă, neinfecțioasă, dar viabilă. Persistența chlamidiilor în formă nereplicativă, neinfecțioasă, este reversibilă. Adăugarea L-izoleucinei, un aminoacid esențial pentru chlamidii şi pentru celula gazdă, este suficientă pentru activarea dezvoltării chlamidiilor. Se crede că persistența chlamidiilor este rezultatul competiției dintre celula gazdă şi parazitul intracelular pentru L-izoleucină. Tratamentul celulei gazdă cu cicloheximidă – inhibitor al sintezei proteice a celulei gazdă – stopează competiția din partea celulei gazdă şi L-izoleucina rămâne disponibilă pentru sinteza proteică chlamidială. Absența *cisteinei* în mediul nutritiv al celulelor *in vitro* întrerupe diferențierea corp reticulat – corp elementar. Efectul este reversibil.

Tratamentul cu penicilină nu influențează diferențierea corpilor elementari în corpi reticulați, dar inhibă procesul diviziunii binare. Astfel, se dezvoltă structuri chlamidiale ale corpilor reticulați cu morfologie anormală, de dimensiuni mari, dar formarea corpilor elementari este blocată. Scoaterea penicilinei din mediul de cultivare duce la înmugurirea extensivă şi subdiviziunea internă a structurilor aberante, cu formarea corpilor reticulari tipici, care se maturează în corpi elementari infecțioşi.

Deşi chlamidiile nu conțin peptidoglican, penicilina, ampicilina şi cicloserina au efect inhibitor asupra dezvoltării corpului reticulat în corpi elementari. Cloramfenicolul şi clortetraciclina inhibă dezvoltarea intracelulară a chlamidiilor, ca şi antibioticele ce inhibă sinteza acizilor nucleici.

Chlamidiile induc sinteza interferonilor, cu efect inhibitor asupra creşterii agentului patogen în culturi celulare. Nivelul înalt al IFNγ limitează complet creşterea chlamidiilor, iar nivelul scăzut induce dezvoltarea formelor intracelulare cu morfologie aberantă. Interferonii favorizează creşterea formelor aberante şi infecția persistentă.

Infecțiile inaparente ale trompelor determină infertilitatea. Eliminarea factorilor inductori ai persistenței duce la reluarea creşterii active şi dezvoltarea corpilor elementari infecțioşi. Reactivarea infecției chlamidiale *in vivo*, se produce în condiții de imunosupresie, ceea ce implică rolul răspunsului imun în infecția persistentă.

Chlamidiile se izolează mai frecvent de la femeile cu infecție gonoreică.

Chlamidiile infectează celulele epiteliale ale mucoaselor, dar este puțin probabil ca acesta să fie situsul infecției persistente, datorită turnoverului natural al acestor celule. Turnoverul natural şi liza celulelor exfoliate duce la eliberarea antigenelor chlamidiale şi la stimularea răspunsului imun, dar şi la pierderea celulelor infectate persistent.

Se pare că *Chl. trachomatis* realizează infecții persistente în țesutul subepitelial.

Chl. pneumoniae produce infecții acute ale tractului respirator (faringite, bronşite, pneumonii) sau complicații tardive (astm, rinită alergică, afecțiuni cardiace, scleroză multiplă, boala Alzheimer) (Friedman şi colab., 2004). Există foarte multe studii care demonstrează rolul infecției chlamidiene în ateroscleroză. Corpii elementari (CE) de *Chl. pneumoniae* sunt endocitați de macrofagele alveolare, unde se diferențiază în corp reticulat (CR), ce se multiplică şi formează o incluzie matură. Monocitele circulante sunt infectate, iar apariția incluziilor modulează aderența acestora la endoteliul vascular. Macrofagele aderate migrează ulterior în intima veselor de sânge, unde vor determina infecția altor tipuri celulare, inclusiv a macrofagelor arteriale, care vor prelua LDL şi vor deveni astfel macrofage cu aspect "spumos", datorită colesterolului depozitat. Fibrele musculare netede vor fi de asemenea infectate de către CE şi proliferează, iar celulele endoteliale infectate secretă o serie de citokine, care în final vor duce la destabilizarea plăcii de aterom şi la formarea trombilor, cu creşterea riscului de infarct miocardic (fig. 316).

Diagnosticul direct presupune cultivarea chlamidiilor pe culturi de celule (McCoy – fibroblaste de şoarece, HeLa 229 – carcinom de col uterin uman, BHK-1-fibroblaste de hamster), evidențierea incluziilor chlamidiale direct în produsul patologic (pe frotiuri colorate Giemsa metoda modificată, cu iod, sau prin imunofluorescență cu anticorpi monoclonali) decelarea antigenelor chlamidiale în produsele patologice (ELISA, imunofluorescență directă, imunoblot) sau detectarea acizilor nucleici (hibridizare, PCR). Diagnosticul serologic se bazează pe evidențierea anticorpilor specifici de tip IgM (marker de infecție acută), IgG şi IgA (marker de reacutizare a infecției).

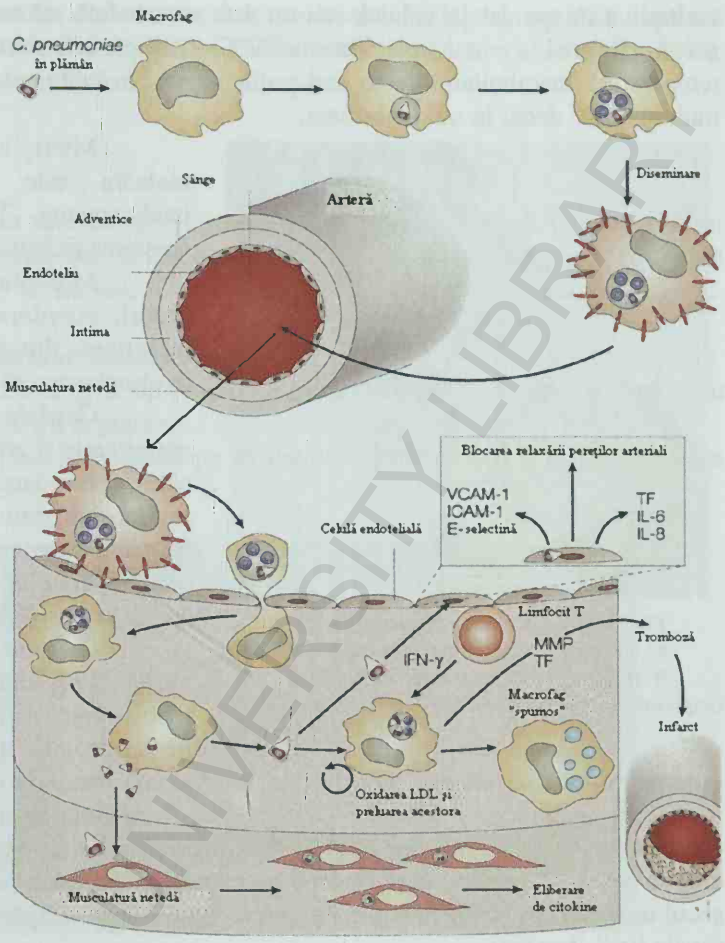


Fig. 316. Mecanismele posibile prin care *Chl. pneumoniae* poate favoriza ateroscleroza (TF – *tissue factor*) (Campbell şi Kuo, 2004).

13.2. Rickettsii

Rickettsiile sunt bacterii parazite obligat intracelulare, Gram negative, aerobe, de dimensiuni mici, pleomorfe: coci 0,3–0,4 µm izolați sau perechi, cocobacili (0,3 x 1–2 µ), bacili (3–4 µm) şi mai rar de forma unor filamente subțiri (10–20 µm).

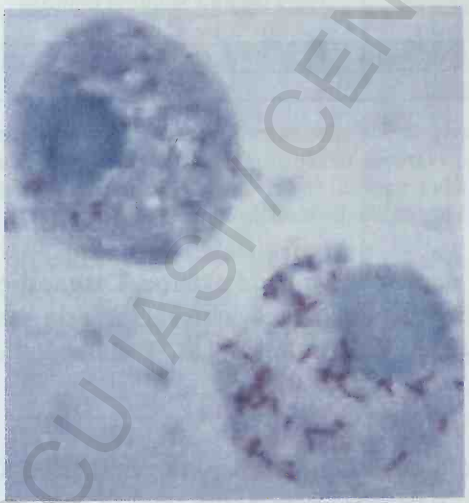


Fig. 317. R. rickettsii pe frotiu din hemolimfă de căpuşă, colorat după metoda Gimenez (http://www.textbookofbacteriology.net/Rickettsia_2.html).

Rickettsiile au afinitate scăzută pentru coloranți. Nu se colorează Gram, dar se colorează după contactul prelungit cu colorantul, prin metoda Gracian (foloseşte colorant Giemsa) sau prin metoda Gimenez (cu fuxină bazică 0,4% şi verde malachit) (fig. 317).

Rickettsiile supraviețuiesc un timp foarte scurt în mediul extracelular, cu excepția *Rochalimaea quintana* (agentul etiologic al febrei de tranşee), care creşte pe mediu inert.

Rickettsiile au multe dintre capacitățile metabolice ale bacteriilor, dar pentru exprimarea lor necesită cofactori ai celulei gazdă. Membrana citoplasmatică a rickettsiilor izolate este foarte permeabilă, ceea ce explică dependența lor de mediul intracelular al gazdei. Respirația pare a fi *aerobă*, deoarece în oul embrionat se multiplică mai bine în zonele bine aprovizionate cu O_2.

Rickettsiile se dezvoltă numai în celulele anumitor țesuturi ale speciilor sensibile (fig. 318). Se

PCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

multiplică în special în celulele vii cu rată metabolică scăzută, care au încetat să se multiplice. De aceea, rickettsiile cresc mai bine la 32°C şi după inoculare în sacul scrotal, deoarece la această temperatură metabolismul este mai puţin intens. În culturi de celule, randamentul multiplicării este mult mai mic decât în oul embrionat.

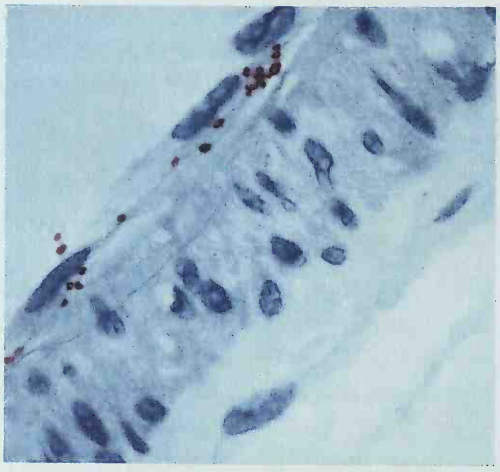


Fig. 318. Evidenţierea imunohistologică a infecţiei endoteliului vascular cu *R. rickettsii* la un pacient cu febră pătată (http://www.textbookofbacteriology.net/Rickettsia_6.html).

Multiplicarea este stimulată de sulfonamide, iar maladia este mai severă în prezenţa acestor medicamente. Tetraciclina şi cloramfenicolul inhibă creşterea rickettsiilor şi pot fi eficiente terapeutic.

Multiplicarea rickettsiilor este, în cele mai multe cazuri, *citoplasmatică*, dar cele care produc procese infecţioase din grupul febrelor pătate se multiplică atât în citoplasma, cât şi în *nucleul* celulei gazdă.

Gazdele naturale ale rickettsiilor sunt mamiferele şi artropodele. Artropodele sunt atât vectori, cât şi rezervoare naturale de rickettsii, la care bacteriile se transmit transovarian. *Rickettsia prowazeki*, agentul tifosului exantematic, este prezentă în conţinutul şi în celulele epiteliale ale tubului digestiv al păduchelui de cap şi de corp, de unde este transmisă la om.

Celulele rickettsiene aderă la suprafaţa celulei gazdă. Tropismul lor pentru *celulele endoteliale* ale vaselor mici de sânge este bine exprimat. Multiplicarea în aceste vase produce vasculita. Celulele îşi măresc volumul şi se necrozează. Modificarea funcţională imediată este creşterea permeabilităţii vasculare, urmată de un proces inflamator cu formarea trombilor, obstrucţia circulaţiei sângelui, transvazarea eritrocitelor. Angeita vaselor mici din tegument, creier, miocard este suportul manifestărilor clinice: erupţia peteşială tegumentară (începe pe trunchi şi continuă pe membre), starea de confuzie mentală, şocul terminal. În cazul tifosului epidemic, boala poate reapărea după ani de zile de la prima infecţie (boala Brill-Zinsser).

Din punct de vedere clinic, rickettsiile aparţin următoarelor 3 grupuri: grupul rickettsiilor tifos epidemic, endemic şi grupul febrei pătate (tabelul 29).

Tabelul 29.

Clasificarea rickettsiilor în funcţie de caracteristicile epidemiologice şi clinice ale infecţiei

Specia	*R. prowazekii*	*R. typhi*	**R.rickettssii*
Boala	Tifos epidemic	Tifos endemic	Febra pătată a Munţilor Stâncoşi
Rezervor	Uman	Rozătoare	Rozătoare, câini, căpuşe
Vector	Păduchi	Purici	Căpuşe
Calea de eliminare din vector	Fecale	Fecale	Muşcătură

* Pe lângă *R. rickettssii*, grupul febrei pătate mai cuprinde o serie de alte specii care produc rickettsioze umane: *R. conorii*, *R. mongolotimonae* şi *R. slovaca* (febra butunoasă), *R. akari* (varicela rickettsiană), *R. japonica* (febra pătată japoneză), *R. sibirica* (tifosul căpuşei din Asia de Nord), *R. africae* (febra muşcăturii de căpuşă africană), *R. helvetica* (perimiocardită), *R. australis* (tifosul căpuşei de Queensland) şi *R. honei* (febra pătată din insulele Flinders) (Todar, 2009).

La om, infecţia este urmată de imunitate parţială la reinfecţia din surse externe. Diagnosticul de laborator completează diagnosticul clinic şi se bazează pe evidenţierea antigenelor prin teste ELISA, a anticorpilor prin imunofluorescenţă indirectă sau a ADN prin teste PCR. Tratamentul de elecţie este doxiciclina.

13.3. *Coxiella burnetii* (ordinul *Legionellales*, familia *Coxiellaceae*) (agentul febrei Q)

(Q – *query fever* sau *Queensland fever*) este un cocobacil Gram negativ, intracelular, care se aseamănă foarte mult cu rickettsiile, însă diferenţele genetice şi fiziologice au motivat separarea acestora într-un gen aparte. Spre deosebire de ricketsii, *Coxiella* este rezistentă la căldură (60°C timp de 30 min),

uscăciune şi lumină solară (trăieşte luni de zilele în fecalele uscate sau în lapte), ceea ce uşurează transmiterea de la o gazdă la alta şi poate fi cultivată pe medii artificiale (Anders şi colab., 2009). *Coxiella* este sensibilă la doxicilină şi tetraciclină.

13.4. Genul *Ehrlichia*

Reprezentanţii genului *Ehrlichia* sunt bacterii Gram negative mici (0,5 µm), paraziţi obligat intracelulari. Infectează leucocitele circulante, se multiplică în vacuolele fagocitare şi formează aglomerări cu aspect de morulă (fig. 319). La om, *E. chaffensis* produce infecţia monocitelor, iar *E. ewingii* infectează granulocitele.

Ehrlichia se aseamănă cu *Chlamydia*, deoarece ambele se multipică în vacuole intracelulare. Infecţiile produse de *Ehrlichia* se manifestă prin simptome nespecifice: febră, frisoane, mialgie, rău general, senzaţia de vomă, anorexie, pierdere în greutate.

Diagnosticul infecţiei cu *Ehrlichia* se bazează pe evidenţierea microscopică a incluziilor cu aspect de morulă în leucocitele infectate.

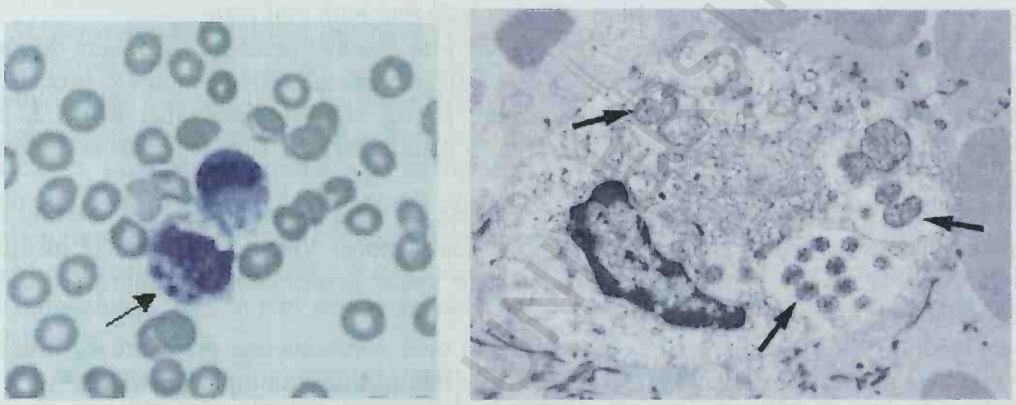


Fig. 319. Monocit circulant infectat, cu aspect de morulă (stânga). Imagine electrono-optică a unei incluzii cu aspect de morulă într-un leucocit din măduva osoasă la un pacient cu ehrlichioză (dreapta) (http://www.cvbd.org/4029.0.html).

Pentru confirmare se foloseşte metoda fluorescenţei indirecte. *Ehrlichia* este sensibilă la doxiciclină şi rifampicină.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

14. MICOPLASME

Micoplasmele sunt cele mai mici organisme care trăiesc liber în mediile naturale, cu capacitatea de multiplicare pe substratul nutritiv inert. Se deosebesc de alte bacterii, atât prin dimensiunile mici (125–250 nm), cât şi prin absenţa peretelui celular. Trec prin filtrele cu pori de 450 nm, fiind asemănătoare, din acest punct de vedere, cu chlamidiile şi cu virusurile mari. Absenţa peretelui constituie un criteriu taxonomic: micoplasmele sunt grupate într-o clasă separată – *Mollicutes* (în limba latină = piele moale). S-au izolat peste 150 de specii, dintre care 15 de la om, iar restul de la animale şi plante, dar numărul acestora în mediile naturale este mult mai mare.

Micoplasmele sunt celule foarte *pleomorfe*, datorită absenţei peretelui rigid: sunt delimitate de o membrană trilaminară, ce conţine steroli. Nu sintetizează steroli, fiind singurele procariote care necesită adăugarea *sterolului* în mediul de creştere pentru sinteza membranei celulare. Datorită absenţei peretelui mureinic, sunt rezistente la acţiunea penicilinei, dar sunt sensibile la tetraciclină şi eritromicină.

Cultivare. Micoplasmele cresc pe medii inerte ce conţin lipoproteine şi steroli: *bulionul peptonat* suplimentat cu lichid ascitic sau ser animal (cal, iepure) 30%. După 2–3 zile, mediul lichid rămâne limpede sau se tulbură uşor. Micoplasmele cresc predominant la suprafaţa culturii şi morfologia celulelor este foarte heterogenă.

Pe mediul solidificat cu agar 2%, coloniile sunt mici, suprafaţa este granulară, centrul coloniei este sub nivelul suprafeţei, inclus în agar. Creşterea este inhibată de anticorpii specifici.

Din multitudinea micoplasmelor care trăiesc pe materia organică în mediile naturale, foarte puţine au fost cultivate. Dintre cele cultivate, unele cresc foarte lent pe mediile nutritive disponibile. Micoplasmele au numeroase deficienţe de sinteză a unor molecule şi de aceea necesită pentru cultivare medii complexe, care se bazează pe infuzia de inimă de bovine, peptonă, extract de levuri şi ser cu diferite suplimente. Nu s-au cultivat în cultură pură (axenică) micoplasmele infecţioase pentru insecte şi plante.

Multe micoplasme metabolizează glucoza, produc peroxizi şi lizează hematiile. Sursa de azot este amoniul. Pentru *Ureaplasma,* sursa de azot este ureea. Micoplasmele sunt organisme *saprobionte* pe materia organică în mediile naturale sau sunt parazite cu o distribuţie largă la om, mamifere, reptile, peşti, artropode, plante. Speciile descrise formează o proporţie minoră dintre cele existente în natură. De cele mai multe ori, infecţiile cu micoplasme sunt uşoare şi comune. Rareori, infecţia are efect letal pentru gazdă. Relaţia micoplasmelor cu gazdele pare să evolueze spre simbioză, deoarece spiroplasmele şi fitoplasmele au efecte patogene minime, iar efectele defavorabile asupra insectelor vectoare lipsesc.

Micoplasmele au afinitate pentru membrana citoplasmatică. Habitatul primar al micoplasmelor umane şi animale este suprafaţa mucoaselor tractului respirator, urogenital, digestiv, conjunctiva oculară, glandele mamare şi articulaţiile. Micoplasmele obligat anaerobe s-au găsit numai în rumenul bovinelor şi ovinelor.

Micoplasmele sunt componente ale *microbiotei normale* a cavităţii orale şi se izolează din salivă, de pe epiteliul mucoasei bucale, tonsile, din mucoasa tractului genital, urinar şi respirator. Unele micoplasme fac parte din microbiota normală a tractului genital şi urinar, în special feminin. Diversitatea micoplasmelor genitale este proporţională cu numărul partenerilor sexuali.

Din punct de vedere evolutiv, micoplasmele reprezintă un nivel minim al organizării celulare, un minimum vital. *M. genitalium* este organismul cu cel mai mic genom (de două ori mai mare decât al virusurilor pox), fiind cea mai apropiată de celula teoretică minimală, capabilă de autoreproducere.

De la om s-au izolat *M. hominis, M. salivarium, M. orale, M. fermentans, M. pneumoniae, M. genitalium, M. urealiticum* etc. Atribuirea izolatelor la diferitele specii se face pe baze biochimice şi serologice: specificitatea antigenică a glicolipidelor membranare se identifică cu seruri imune în reacţia de fixare a complementului, iar a proteinelor, prin testele ELISA.

Micoplasmele manifestă, în general, specificitate de organ şi de ţesut: *M. pneumoniae* populează preferenţial tractul respirator, dar s-a izolat din tractul genital, iar *M. genitalium* s-a găsit în primul rând în tractul urogenital, dar şi în tractul respirator.

Micoplasmele infectează persistent culturile de celule animale. Se apreciază că între 10–87% din totalul culturilor celulare sunt infectate cu micoplasme. Culturile celulare reprezintă un habitat artificial nenatural.

În ţesuturile insectelor, micoplasmele sunt paraziţi intracelulari. La mamifere, inclusiv la om, micoplasmele aderă la suprafaţa celulelor ciliate şi neciliate, probabil la resturile de acid sialic şi la glicolipidele sulfatate, sunt înglobate de PMN şi de macrofage, dar probabil că nu pătrund în celulele epiteliale.

Mecanismul pătrunderii micoplasmelor în celulele gazdei nu este clar: unele aderă de celulele gazdă prin structuri moleculare polare specializate şi apoi sunt internalizate, dar altele sunt lipsite de astfel de structuri.

M. penetrans este cel mai ilustrativ exemplu de micoplasme care pătrund activ într-o varietate de celule mamaliene, multe dintre ele cu capacitate fagocitară minimă. Internalizarea patogenului într-o celulă gazdă este iniţiată de legarea patogenului de celulă. Aderenţa declanşează eliberarea unui semnal, urmată de rearanjarea amplă a proteinelor microtubulilor şi a microfilamentelor. Se consideră că localizarea intracelulară protejează micoplasmele faţă de acţiunea efectorilor imunitari şi a antibioticelor. Astfel se explică dificultatea eradicării micoplasmelor din culturile celulare infectate. Rezidenţa intracelulară favorizează infecţiile cronice latente (Razin, 1998).

Micoplasmele par să aibă specificitate de gazdă. La om şi animale, micoplasmele par a fi paraziţi intracelulari, cu tropism pentru celulele mezoteliale (pleură, peritoneu, membrana sinovială a articulaţiilor).

M. pneumoniae produce pneumonia în special la copii şi la tinerii până la vârsta de 20 de ani. Se transmite prin aerosolii infectaţi. Perioada de incubaţie este de 1-3 săptămâni. Infecţia variază de la cea asimptomatică, până la pneumonie severă. Micoplasmele induc sinteza hemaglutininelor la rece pentru eritrocitele de grup 0, la 50% dintre pacienţi, al căror titru este mai mare de 1:64, la 3–4 săptămâni după infecţie.

Ureaplasma urealyticum şi *M. hominis* sunt patogeni ai tractului genital, fiind agenţi etiologici ai uretritei negonococice, bolii inflamatorii pelvice, cervicale, orhitei, epididimitei, care secundar pot duce la sterilitate. Administrarea nejudicioasă a antibioticelor a condus la apariţia rezistenţei la antibiotice, antibiograma fiind absolut necesară.

La animale, micoplasmele produc *pleuropneumonia*, o boală contagioasă, uneori letală a bovinelor. Infecţia este transmisă pe cale aeriană.

Agalactia oilor şi *caprinelor* este o infecţie generalizată, cu leziuni locale în tegument, ochi, articulaţii, uger, scrot. La femele infecţia produce atrofia glandelor mamare.

Porcul, câinele, rozătoarele poartă micoplasme care produc infecţii pleurale, peritoneale, articulare, respiratorii.

Micoplasmele infecţioase pentru păsări sunt transmise pe verticală, prin ou.

Factorii de patogenitate ai micoplasmelor parazite sunt reprezentaţi, în primul rând, de *adezine*. Adezinele sunt proteine membranare care mediază aderenţa la celula gazdă, bine exprimate la *M. pneumoniae* şi *M. genitalium,* sub forma structurilor polare specializate.

După aderenţă, micoplasmele pot să producă fenomene de *citotoxicitate directă* prin stresul oxidativ (radicalul superoxid şi H_2O_2) pe care-l generează şi prin *competiţia pentru nutrienţi.*

Micoplasmele exprimă un pleomorfism extrem şi o *variaţie antigenică* accentuată, consecinţă a plasticităţii fenotipice*.

* Teoria plasticităţii fenotipice consideră că bacteriile răspund modificărilor mediului de viaţă, prin schimbări structurale şi funcţionale (metabolice) profunde, în cadrul aceleiaşi norme genetice.

De cele mai multe ori, la organismele patogene, consecința majoră a plasticității fenotipice este variația antigenică. Termenul de "variație antigenică" sau "comutare fenotipică" înseamnă capacitatea unei specii microbiene de a-şi modifica specificitatea antigenică a componentelor de suprafață (flageli, fimbrii, proteine ale membranei externe, polizaharidul capsular), mărindu-şi capacitatea de colonizare a țesuturilor gazdei şi de evitare a factorilor imunitari. Structurile suprafeței celulare sunt țintele majore ale răspunsului imun humoral.

Generarea unui înveliş antigenic versatil cu o rată înaltă a modificărilor, oferă organismului infecțios modalitatea de a evita efectul neutralizant al anticorpilor.

Unele micoplasme produc *hemolizine*.

Răspunsul imun anti-micoplasme este o modalitate de protecție a organismului dar este implicat în dezvoltarea leziunilor patologice şi în exacerbarea maladiei indusă de micoplasme.

Micoplasmele au efect imunomodulator accentuat, deoarece influențează reactivitatea sistemului imunitar al gazdei: pot induce imunosupresia, stimularea policlonală a limfocitelor T şi B, inducția sintezei citokinelor, stimularea efectului citotoxic al macrofagelor, al celulelor NK şi al celulelor Tc; stimulează expresia receptorilor celulari şi activarea cascadei complementului. Capacitatea imunomodulatoare a micoplasmelor contribuie direct la manifestarea proprietăților de virulență: ele pot evita sau suprima mecanismele de apărare ale gazdei, stabilind astfel o infecție cronică persistentă.

Efectul *imunosupresor* este consecința epuizării de către micoplasme a *argininei,* un aminoacid esențial, pe calea arginin-dihidrolazei.

Micoplasmele şi componentele celulare derivate din micoplasme modulează activitatea macrofagelor, celulelor NK şi răspunsul imun prin intermediul *chemokinelor* şi *citokinelor* stimulatoare şi inhibitoare.

Micoplasmele stimulează sinteza şi secreția *citokinelor proinflamatorii* (TNF-α, IL-1 şi IL-6 produse de macrofage), cu rol major în modularea răspunsului inflamator şi imun.

Citokinele IL-10, IL-13 şi TGF-β favorizează evaziunea micoplasmelor în raport cu factorii protectori ai gazdei, deoarece inhibă funcția fagocitelor, inhibă sinteza citokinelor proinflamatorii şi proliferarea limfocitelor T.

IL-10 este o citokină inhibitorie a răspunsului imun, sintetizată în special de limfocitele Th-2 şi de macrofage şi într-o măsură mai mică de alte celule imunitare. IL-10 inhibă activitatea celulelor prezentatoare de antigen (CPA), inhibă sinteza citokinelor proinflamatorii (IL-1, TNF-α, IFN-γ), stimulează diferențierea limfocitelor B în celule producătoare de IgG_4 (anticorpi citofili).

Multe micoplasme stimulează celulele seriei monocit-macrofag să secrete citokine proinflamatorii, care produc răspuns inflamator local şi sistemic.

TNF-α (produs în special de fagocitele mononucleare, de celulele Th, NK şi de alte celule neimunitare) este mediatorul principal al reacției inflamatorii, al caşexiei, al stării febrile, al eliberării PFA (factorul de agregare plachetară), al şocului septic şi necrozei hemoragice a țesutului tumoral.

Infecția cu micoplasme poate produce maladia articulară acută şi cronică, asemănătoare cu artropatiile inflamatorii, inclusiv cu artrita reumatismală.

Probele se inoculează pe mediu solidificat sau bulion special incubat timp de 3–10 zile, în atmosferă cu 5% CO_2, în condiții microaerofile. Mediul se examinează pentru apariția coloniilor cu aspect de "ou ochi". La ora actuală cultivarea se face pe galerii cu medii microtest care permit şi stabilirea spectrului de sensibilitate la un număr de până la 12 antibiotice (fig. 320).

După infecție se sintetizează anticorpi, care se evidențiază în *reacția de fixare a complementului*, cu antigene glicolipidice extrase cu cloroform-metanol din micoplasmele cultivate.

Testul de *hemaglutinoinhibare* se realizează cu hematii tanate pe care s-au adsorbit antigene de *Mycoplasma*.

Diagnosticul *molecular* al micoplasmelor prin PCR a constituit un test sensibil pentru prezența ADN genomic în lichidul sinovial al pacienților cu artrită reumatoidă. Rezultatele analizei privind prezența ADN de micoplasme în lichidul sinovial al pacienților sunt neconcludente.

POLITEHNICA UNIVERSITY TIMIŞOARA

Fig. 320. Exemplu de kituri utilizate în prezent pentru diagnosticul infecției cu *Mycoplasma.* În imaginea din dreapta sus, aspectul caracteristic, de "ou ochi" al coloniilor de *Mycoplasma* dezvoltate pe mediu solid, repartizat în plăci (http://www.wescor.com/biomedical/im/mycoscreen.html, http://www.tradeindia.com/fp616895/Mycoplasma-Identification-Enumeration-Susceptibility-Kit.html).

Bibliografie selectivă

1. Anders O., Cockrell, D. C., Howe D., Fischer, E. R., Virtaneva K., Sturdevant D. E., Porcella H., Robert A. 2009. Host cell-free growth of the Q fever bacterium *Coxiella burnetii*. PNAS. 106 (11): 4430–4434
2. Barnes R. C. 1990. Infections Caused by *Chlamydia trachomatis* Chapter 6 in Morse, et al, *Sexually Transmitted Diseases.* J.B. Lippincott. Philadelphia
3. Campbell L. A., Kuo C.C. 2004. *Chlamydia pneumoniae* — an infectious risk factor for atherosclerosis? Nature Reviews Microbiology :3–32
4. Hatch T. P. 1996. Disulfide Cross-Linked Envelope Proteins: the Functional Equivalent of Peptidoglycan in Chlamydia? Journal of Bacteriology. 178: 1–5.
5. http://www.studentsguide.in/microbiology/mollicutes-lforms-rickettsias-chalmydias/spirochaetes.html
6. http://www.tradeindia.com/fp616895/Mycoplasma-Identification-Enumeration-Susceptibility-Kit.html
7. http://www.wescor.com/biomedical/im/mycoscreen.html
8. Madigan M. Martinko J., Parker J. 1997. Brock's Biology of Microorganisms. eighth edition. New Jersey: Prentice Hall.,
9. *Ouelette S. P., Byrne G. I. 2004.* Chlamydia pneumoniae*: Infection and disease. In Friedman H., Yamamoto Y, Bendinelli M. ed. Infectious agents and pathogenesis. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data*
10. Todar K. 2009. Web Review of Todar's Online Textbook of Bacteriology. http://www.textbookofbacteriology.net/Rickettsia.html

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

15. DIAGNOSTICUL DE LABORATOR AL INFECŢIILOR MICROBIENE

Bolile transmisibile se află şi în prezent în topul cauzelor de mortalitate şi morbiditate la nivel mondial şi utilizează o proporţie nejustificat de mare din bugetul alocat sănătăţii în ţările în curs de dezvoltare. Conform Organizaţiei Mondiale a Sănătăţii (OMS), diareea acută este cauza a 2.2 milioane decese anual. Infecţiile acute respiratorii (în principal, pneumonia) reprezintă o altă cauză importantă a mortalităţii, estimată la 4 milioane decese anual (WHO, 2003). Numărul cazurilor de pneumonie bacteriană cu *H. influenzae* şi *Str. pneumoniae* şi al tulpinilor rezistente la benzilpeniciline ca şi al bolilor cu transmitere sexuală de origine virală sau bacteriană este în permanentă creştere (WHO, 2003).

Pentru prevenirea şi controlul eficient al principalelor infecţii bacteriene este necesară dezvoltarea unor modalităţi de supraveghere epidemiologică şi monitorizare a maladiilor infecţioase, precum şi existenţa unor tehnici de diagnostic sensibile, specifice şi simple.

15.1. Noţiuni de asigurarea calităţii în bacteriologia clinică

Nomenclatură, definiţii

Asigurarea calităţii (AC) reprezintă ansamblul de acţiuni prestabilite şi sistematice necesare pentru ca un produs sau un serviciu prestat să satisfacă exigenţele calităţii, o iniţiativă care tinde spre "0 erori" şi previne eroarea în loc să o constate *a posteriori* (ISO 8402/1995). AC este procesul complet prin care calitatea raportărilor laboratorului poate fi garantată. Pentru laboratorul de microbiologie, AC înseamnă asigurarea obţinerii unui rezultat corect, în timpul optim, din proba adecvată, recoltată corespunzător, de la pacientul potrivit, cu interpretarea rezultatelor pe baza datelor de referinţă corecte, la cel mai bun preţ.

Calitatea reprezintă aptitudinea unui produs, procedură sau serviciu de a satisface **cerinţele cunoscute** şi **potenţiale** ale utilizatorului (medicul de familie, medicul specialist, pacientul), la nivel tehnic, economic (performanţe maxime la costuri competitive), ecologic (are în vedere protecţia personalului şi a mediului) şi informativ (un rezultat trebuie uneori însoţit de un comentariu şi de asemenea, de explicarea necesităţii întârzierii răspunsului, atunci când este cazul) (ISO 8402/1995).

Cerinţele sau **necesităţile cunoscute** se referă la analize uzuale ale produselor biologice clasice (sânge, urină etc.), care dacă sunt realizate corect facilitează precizarea diagnosticului, iar cele **potenţiale** se referă la analize noi, realizate prin tehnici moderne din alte produse decât cele clasice (de exemplu, firul de păr), care necesită interpretarea datelor obţinute ca şi posibilitatea de identificare a interferenţelor şi a cuantificării acestora. Normele în vigoare care reglementează funcţionarea şi asigurarea calităţii în laboratorul de microbiologie sunt:

- Ordinul MSP 1301/2007 /MO 617/06.11.2007 privind aprobarea Normelor privind funcţionarea laboratoarelor de analize medicale;
- Standardul 15189 – Laboratoare medicale. Cerinţe particulare pentru calitate şi competenţă;
- Contract- cadru privind condiţiile acordării asistenţei medicale în cadrul sistemului de asigurări sociale de sănătate pentru anul 2010;
- Norme la Contract – Cadru;

- Ordinul MSP 1301/20.07.2007, secțiunea a 9-a Managementul calității, Controlul intern de calitate și evaluarea externă a calității în laboratorul de analize medicale.

Sistemul analitic este definit ca ansamblul de mijloace analitice constituite dintr-o metodă, un aparat, unul sau mai multe programe informatice, unul sau mai mulți reactivi, una sau mai multe soluții (eșantioane) de calibrare, de control care să permită determinarea naturii unui constituent sau a concentrației acesteia, urmând un protocol bine definit.

Calificarea este operațiunea destinată demonstrării faptului că un sistem analitic sau un instrument funcționează corect și poate furniza rezultatele așteptate. Pentru personal, calificarea corespunde formării dobândite și impuse de reglementările în vigoare și care este reținută prin formarea continuă internă sau externă a personalului de laborator.

Procedurile sunt operațiuni de lucru, tehnici și moduri care figurează în documentația scrisă a fiecărui laborator.

Transferabilitatea este calitatea unei proceduri de lucru de a permite difuzarea sa și compararea cu rezultatele obținute în alte laboratoare.

Valorile de referință sunt obținute pe o populație de referință, exprimate în general cu limite minime/maxime, stabilite în funcție de tehnicile utilizate sau eventual verificate, atunci când utilizează datele din literatura de specialitate.

Este preferabilă utilizarea noțiunii de **valoare de referință** și nu cea de valoare "normală" sau standard.

Validarea este operația prin care se verifică faptul că un rezultat a fost obținut în condiții tehnice corespunzătoare; verificarea conformității condițiilor de execuție cu cele menționate în procedurile de operare standard și ținând cont de rezultatele obținute cu eșantioanele de control = **validare analitică** și **validare biologică** = controlul validității și coerenței rezultatelor obținute prin analiza unor probe, cu rezultate anterioare obținute în laborator (WHO, 2003; REMIC, 2008).

Programele de asigurare a calității reprezintă o modalitate eficientă de a menține standardele de performanță ale laboratoarelor de diagnostic, precum și actualizarea standardelor in vigoare atunci când este necesar. În microbiologie, calitatea ia în considerație durata, costul, precum și utilitatea sau relevanța clinică a testului.

Pentru a fi de bună calitate, un test de diagnostic trebuie să fie relevant clinic, adică trebuie să ajute la prevenirea sau tratarea bolii. Parametrii de calitate ai unui test de diagnostic sunt: fiabilitatea (rezultatul obținut este corect?), reproductibilitate (se obține același rezultat atunci când testul se repetă?), viteza (este un test destul de rapid pentru a fi util medicului în prescrierea tratamentului?) și raportul cost-beneficiu (este costul de testare rezonabil în raport cu beneficiul pentru pacient și comunitate?) (WHO, 2003).

Factorii care influențează fiabilitatea și reproductibilitatea rezultatelor de laborator sunt reprezentați de:

- **personal** (performanța unui tehnician de laborator este direct legată de calitatea educației și a formației profesionale primite, de personalul cu experiență, precum și de condițiile de angajare);
- **factorii de mediu** (spațiu inadecvat de lucru, de iluminat, sau de ventilație, temperaturi extreme, nivelul de zgomot excesiv sau periculos);
- **calitatea produselor biologice** - metoda și timpul de prelevare a probelor și sursa de recoltare sunt de multe ori în afara controlului direct al laboratorului, deși acesta poartă responsabilitatea pentru eliberarea rezultatelor. De aceea este foarte importantă elaborarea de către laborator și reînnoirea periodică a instrucțiunilor de recoltare și transport al probelor și punerea acestora la dispoziția clinicienilor și a întregului personal medical implicat în realizarea acestei manevre;
- **calitatea reactivilor, a produselor chimice, a sticlăriei, a mediilor de cultură, a animalelor de laborator;**
- **metoda de testare** (unele metode sunt mai fiabile decât altele);
- **echipamente** (lipsa de echipamente, utilizarea incorectă sau întreținerea necorespunzătoare a acestora);

BCU "IOAN SLAVICI" UNIVERSITY LIBRARY

- **examinarea şi citirea rezultatelor** (citirea superficială sau examinarea un număr insuficient de câmpuri microscopice poate genera erori);
- **raportarea** (erori de transcriere, sau rapoarte incomplete).

Calitatea interpretării rezultatelor testului

Interpretarea este de o importanță deosebită în microbiologie. În fiecare stadiu al diagnosticului, rezultatele ar trebui să fie interpretate în scopul de a selecta metodele de testare optime, în termeni de durată şi fiabilitate, pentru următoarea etapă de examinare.

Asigurarea calității în cadrul laboratorului de microbiologie

AC in microbiologie este suma tuturor activităților prin care un laborator garantează că rezultatele testelor realizate sunt de bună calitate. Acestea trebuie să fie cuprinzătoare pentru a acoperi fiecare etapă, de la recoltare până la raportul final către clinician (fig. 321), raționale, pentru a permite identificarea punctelor critice, aplicate cu o periodicitate regulată, pentru a asigura monitorizarea continuă a procedurilor de testare şi cu o frecvență optimă, pentru a detecta şi corecta erorile atunci când apar.

Una dintre abordările comune ale implementării sistemului de asigurare şi control al calității (AC/CC) este "sistemul celor 5 D (engl.)" (EA 04/10, ISO/IEC 17025):

- *Decide* care sunt punctele critice în care este relevant să se realizeze managementul calității;
- *Descrie* cine ce face, când şi cum;
- *Realizează (engl. Do)* ceea ce ai decis şi descris;
- *Documentează* ceea ce s-a realizat în mod real;
- *Verifică (controlează) (engl. Deem)* dacă procedurile şi metodele utilizate au dat rezultatele dorite şi remediază, acolo unde este necesar.

Pentru a putea decide care sunt punctele critice de control al calității în cursul realizării unei analize, trebuie ca mai întâi să se schițeze un flux de lucru de la prelevarea probelor până la raportarea rezultatelor (fig. 321). Toate etapele din fluxul de lucru vor fi analizate şi se va decide care dintre ele necesită o procedură operațională scrisă. Este foarte important ca aceste puncte să fie corect identificate pentru că lipsa unei proceduri operaționale poate influența calitatea analizei. Pe de altă parte, numărul procedurilor trebuie limitat la minimum posibil, pentru a diminua probabilitatea apariției erorilor rezultate din nerespectarea procedurilor scrise.

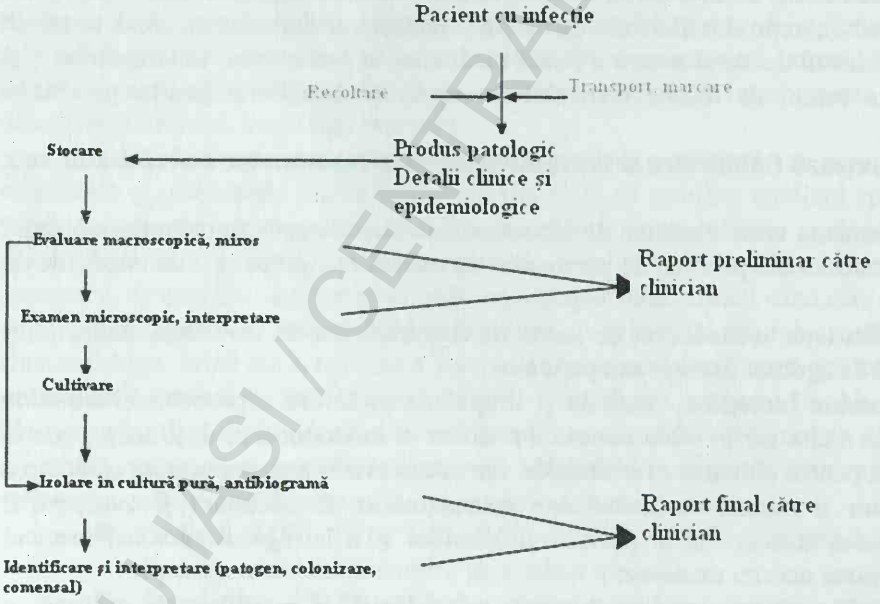


Fig. 321. Fluxul etapelor preanalitice, analitice şi post-analitice ale diagnosticului microbiologic (WHO, 2003).

Între fixarea punctelor critice pentru managementul calității şi realizarea practică a deziderатului, există un echilibru foarte sensibil. De exemplu, temperatura este un factor critic pentru analizele microbiologice calitative, dar există numeroase opinii şi întrebări privind modalitatea corectă de evaluare a acestui parametru: intervalul optim de monitorizare a temperaturii este cel zilnic,

IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

săptamânal sau lunar? monitorizarea temperaturii se realizează într-un singur punct sau este necesar să se cunoască variația sa spațială? termometrele trebuie calibrate la fiecare °C, pentru toate temperaturile pentru care sunt utilizate sau se poate extrapola plecând de la 2 puncte de calibrare?

Un bun sistem de management al calității este cel care dă rezultate satisfăcătoare pentru sistemul AC/CC, fără a se exagera însă în realizarea acestuia. Ca regulă, se va acorda prioritate procedurilor sau echipamentelor care influențează în mod direct rezultatele analizei.

Există două tipuri de control al sistemului de asigurare a calității: intern şi extern. Fiecare laborator are un program de **verificare internă** a calității (CIC) testelor efectuate care implică, în mod ideal: monitorizarea continuă a calității testării şi verificarea tuturor etapelor de execuție, de la recoltare la raportare.

Controlul extern (CEC) se numeşte sistem de evaluare a calității, în care performanța unui laborator este controlată de către o agenție externă. În unele țări, participarea este obligatorie, fiind reglementată legal (refuzul de participare sau insuficienta participare poate antrena sancțiuni penale) şi necesară pentru acreditare. Evaluarea externă a calității implică: monitorizarea periodică a calității de testare şi verificarea la fața locului a metodelor de identificare şi, uneori, a tehnicilor de izolare. Controlul retroactiv permite confruntarea rezultatelor interlaboratoare, în vederea ameliorării calității serviciilor prestate de laboratoarele participante. În vederea realizării CEC, organismul extern furnizează tuturor laboratoarelor acelaşi eşantion, caracterizat, colectează rezultatele obținute şi le transmite împreună cu comentariile unităților participante. Participarea trebuie să fie loială, riguroasă, fidelă, pentru că datele furnizate intră în analize globale efectuate la nivel național. Rezultatele individuale şi globale ale CEC trebuie cunoscute de către întreg colectivul laboratorului pentru a putea remedia erorile care au putut fi obiectivate în urma CEC, a înlocui metodele neadecvate sau a îmbunătăți sistemul de asigurare a calității în cazul în care erorile evidențiate de participarea la CEC sunt aparent inexplicabile. Deciziile impuse la nivelul laboratorului de către participarea la CEC trebuie păstrate în arhiva laboratorului timp de minimum 5 ani. Aceasta permite identificarea unor erori repetate, iar în acest caz laboratorul este inspectat de o comisie de control al calității. Se recomandă de asemenea participarea la CEC organizate de diferite organisme externe etc.

CRITERII DE CALITATE ÎN MICROBIOLOGIE

Relevanța clinică

Analiza microbiologică a diferitelor probe se realizează în scop preventiv, de diagnostic, prognostic sau terapeutic. Personalul cu studii superioare care lucrează într-un laborator de microbiologie are responsabilitatea prelevării corecte a probelor, a executării analizei de laborator a probei, validării rezultatelor şi la nevoie, confruntării acestora cu date complementare (clinice, epidemiologice etc.), participând deci în mod indirect la interpretarea rezultatelor obținute. Un criteriu important de calitate pentru un test microbiologic este relevanța clinică care defineşte cât de mult contribuie un anumit test la prevenirea sau vindecarea bolilor infecțioase.

Relevanța clinică poate fi asigurată doar atunci când există o bună comunicare între clinician şi laborator. De exemplu, dacă în sputa sau în exudatul faringian al unui pacient spitalizat sunt identificate doar câteva colonii de bacterii Gram negative, identificarea de certitudine şi realizarea antibiogramei nu au relevanță clinică, deoarece nu vor avea nici un efect asupra tratamentului pacientului. Dacă este izolat *Str. pyogenes*, antibiograma nu are nici o relevanță clinică, din moment ce benzilpenicilina este antibioticul de elecție. În cazul în care *E. coli* este izolată dintr-un caz sporadic de diaree fără urme de sânge, identificarea serotipului este lipsită de relevanță clinică, deoarece nu există nici o corespondență între serotip şi patogenitate. În cazul în care un frotiu colorat Gram indică "microbiotă mixtă potențial anaerobă", identificarea de rutină a anaerobilor este lipsită de relevanță clinică. Aceasta ar fi costisitoare în timp şi materiale şi nu ar influența tratamentul pacientului. Dacă o levură este izolată din tractul respirator, trebuie realizate teste de identificare pentru *Cryptococcus sp.* (WHO, 2003).

Fiabilitatea

Pentru testele care dau rezultate cantitative, fiabilitatea este măsurată prin exactitatea rezultatelor (apropierea de valoarea reală): analiza concentrației antibioticului în ser, determinarea valorii concentrației minime inhibitorii (CMI), determinarea titrului de anticorpi din ser.

Pentru testele care dau rezultate calitative, fiabilitatea este măsurată prin corectitudinea rezultatului: identificarea agenților patogeni, testarea sensibilității la antibiotice prin metoda disc difuzimetrică.

Utilizarea metodelor standardizate, precum și a terminologiei standard și a nomenclaturii recunoscute pe plan internațional pentru microorganisme sunt esențiale pentru fiabilitate, de exemplu: *S. aureus*, nu "stafilococi patogeni"; *Str. pyogenes*, nu "streptococi hemolitici" (WHO, 2003).

Reproductibilitatea sau precizia unui test microbiologic este influențată de lipsa de omogenitate a probelor (o singură probă de la un pacient poate să conțină mai mult de un organism, iar culturile repetate pot duce la izolarea de organisme diferite), de lipsa de stabilitate (microorganismele dintr-o probă se pot multiplica cu rate diferite, iar pentru a îmbunătăți precizia unui test, probele ar trebui să fie testate cât mai curând posibil după recoltare).

Eficiența unui test microbiologic este capacitatea acestuia de a furniza un diagnostic corect privitor la un agent patogen sau la o condiție patologică. Acest parametru este măsurat prin sensibilitate și specificitate.

Sensibilitatea este definită ca numărul total de rezultate pozitive / numărul total de pacienți infectați. Aşadar, cu cât sensibilitatea unui test este mai mare, cu atât numărul rezultatelor fals-negative este mai mic (de exemplu, sensibilitatea mediului MacConkey este slabă pentru izolarea *S. typhi* din scaun, din cauza creşterii rapide pe acest mediu a bacteriilor nepatogene intestinale) (WHO, 2003).

Specificitatea se defineşte ca fiind numărul total de rezultate negative / numărul total de pacienți neinfectați. Asadar, cu cât specificitatea unui test este mai mare, cu atât numărul rezultatelor fals-pozitive este mai mic (de exemplu, colorația Ziehl-Neelsen a unui frotiu din spută este foarte specifică pentru diagnosticarea tuberculozei, dar pe un frotiu de urină este mult mai puțin specifică, deoarece oferă foarte multe rezultate fals pozitive, datorită prezenței micobacteriilor atipice) (WHO, 2003).

Sensibilitatea și specificitatea unui test sunt interdependente. Prin reducerea nivelului de discriminare, sensibilitatea unui test poate fi crescută, dar cu reducerea specificității și vice-versa.

În prezent au fost elaborate, la nivel internațional, *ghiduri de bună practică* de laborator care nu se referă în primul rând la metodele utilizate (microbiologul are libertatea de a alege metodele optime pe baza recomandărilor societăților științifice naționale sau internaționale de profil, sau validate chiar în laborator, însă în cazul din urmă, numai cu condiția ca rezultatele obținute să fie reproductibile). Ghidurile de bună practică de laborator conțin reguli care se referă în primul rând la dotarea unui laborator, la organizarea acestuia, la modalitățile de evaluare sau control intern, de înregistrare a datelor obținute în toate etapele analizelor de laborator, de la prelevarea probelor până la eliberarea rezultatelor (REMIC, 2008). Procedurile de operare, împreună cu controlul calității, reprezintă elemente ale sistemului de asigurare a calității, iar punerea lor în practică permite verificarea de către autoritățile de profil.

REGULI DE FUNCȚIONARE A UNUI LABORATOR DE CONTROL MICROBIOLOGIC

Organizarea laboratorului

Orice laborator care realizează analize microbiologice trebuie să aibă un sistem de asigurare a calității bazat pe documente scrise (proceduri de operare standard) pentru fiecare etapă a analizei microbiologice efectuate, ca și pentru condițiile de execuție (instrucțiuni de lucru). Calitatea unei analize microbiologice depinde nu numai de calitatea analizei în sine, ci și de organizarea generală a laboratorului, calificarea și motivarea personalului (ISO 17025, REMIC, 2008). Controlul intern al calității începe cu elaborarea procedurilor de operare care include toate etapele de realizare a unei analize. Manualul de operare trebuie respectat, revizuit și actualizat periodic.

Laboratorul trebuie să aibă o identitate bine stabilită în cadrul organizației din care face parte sau să aibă personalitate juridică. Organizarea și funcționarea laboratorului trebuie să îndeplinească criteriile prevăzute de lege, atât pentru sediul permanent, cât și pentru punctele de lucru sau facilitățile de analiză pe teren.

Laboratorul:

a) Va avea personal de conducere cu autoritatea şi competenţa necesare îndeplinirii sarcinilor de serviciu;
b) Va aduce dovezi că personalul de laborator nu este supus nici unei presiuni de ordin financiar sau comercial care ar putea influenţa negativ calitatea muncii sale;
c) Acolo unde este cazul vor fi nominalizaţi manageri adjuncţi pentru a suplini personalul de conducere când acesta lipseşte din laborator;
d) Participă la exerciţii de inter-comparare între laboratoarele de profil.

Sistemul calităţii:

Documentaţia sistemului calităţii dintr-un laborator trebuie să conţină pe lângă procedurile operaţionale, următoarele documente adiţionale:

a) lista personalului de laborator cu semnătură autorizată;
b) procedura laboratorului pentru realizarea trasabilităţii măsurării;
c) unde este cazul, o procedură care stabileşte cum se documentează şi se urmăresc toate modificările introduse în activitatea de analiză curentă;
d) procedurile pentru echipamentele majore şi materialele de referinţă utilizate;
e) procedura pentru acţiuni corective;
f) procedura pentru reclamaţii;
g) procedura pentru păstrarea confidenţialităţii şi proprietăţii intelectuale, dacă este cazul.

Atunci când este nevoie de implementarea unor acţiuni corective, acestea trebuie documentate. Responsabilul cu asigurarea calităţii va supraveghea punerea în aplicare a acestor măsuri, cu respectarea calendarului stabilit.

Laboratorul va asigura calitatea rezultatelor furnizate pacienţilor, prin implementarea unor controale periodice. Procedura de control face obiectul reviziilor periodice şi va include cel puţin următoarele aspecte:

a) participarea la exerciţii de inter-comparare şi teste de capabilitate;
b) utilizarea cu regularitate a materialelor de referinţă şi/sau materialelor cu caracteristici cunoscute, preparate în laborator, ca parte a controlului de calitate al laboratorului;
c) repetarea analizelor pe probele conservate (contra probe), unde este cazul.

Organizarea unui sistem de calitate în laborator este responsabilitatea unei persoane desemnate de către director sau de şeful de laborator **cu asigurarea calităţii** şi priveşte mai multe aspecte:

Stabilirea unei organigrame a laboratorului:

- stabilirea fişelor de post (se asigură că personalul corespunde din punctul de vedere al numărului, educaţiei, instruirilor periodice, cunoştinţelor tehnice şi experienţei, pentru funcţiile pe care le ocupă şi domeniul de activitate declarat);
- asigură formaţia personalului pentru o anumită sarcină şi instruirea permanentă a personalului;
- pune la dispoziţia personalului procedurile de operare şi instrucţiunile de lucru cuprinse în ghidurile de specialitate;
- informează personalul cu privire la orice decizie sau introducere de noi proceduri sau instrucţiuni de lucru;
- menţine înregistrările relevante privind calificarea, instruirea, aptitudinile, experienţa şi competenţa personalului;
- se asigură că normele de protecţia muncii sunt cunoscute, respectate şi aplicate.

Obligaţiile personalului cu studii superioare din laborator:

- validarea analizelor (tehnică şi biologică);
- semnarea buletinelor;
- transmiterea lor fără întârziere.

Obligaţiile personalului:

- trebuie să se conformeze la toate procedurile şi instrucţiunile de lucru în vigoare din laborator.

BCU "LUCIAN BLAGA" UNIVERSITY LIBRARY

Spațiul și condițiile de mediu:

- clădirea laboratorului, spațiile de testare, sursele de energie, iluminatul, sistemul de încălzire și ventilația, trebuie să asigure condițiile optime de realizare a analizelor (laboratorul de microbiologie necesită spații luminate, aerate și fără praf);
- condițiile de mediu în spațiile în care se desfășoară analizele trebuie să nu conducă la invalidarea rezultatelor sau să influențeze negativ acuratețea și precizia măsurării; trebuie acordată o atenție deosebită acestor aspecte atunci când analizele se desfășoară în alte spații decât cele permanente ale laboratorului;
- se va asigura o separare efectivă a spațiilor învecinate în care se desfășoară activități incompatibile;
- accesul și utilizarea spațiilor destinate analizelor vor fi definite și controlate;
- se vor asigura curățenia și buna gospodărire a laboratorului.

Procedurile de lucru:

- toate etapele de lucru din fazele pre-analitică, analitică și post-analitică ale încercării (analizei), trebuie documentate în proceduri de operare standard (POS);
- procedurile în vigoare, scrise, verificate, aprobate, datate sunt respectate de către personal;
- revizuirile procedurilor sunt notate, aprobate, înregistrate, datate și comunicate întregului personal al laboratorului;
- se întocmesc fișe cronologice ale tuturor operațiunilor (fluxuri de lucru) care să permită supravegherea respectării instrucțiunilor de lucru;
- în cazul în care se semnalizează o eroare de funcționare sau de executare, responsabilul cu calitatea ia inițiativa înlocuirii acesteia și înregistrează acțiunile corective întreprinse; responsabilul cu calitatea asigură gestionarea adecvată a arhivelor.

Instalațiile, echipamentul, instrumentarul, consumabilele, reactivii, materialele de referință:

- laboratorul va fi dotat cu toate echipamentele și materialele de referință necesare pentru desfășurarea corectă a analizelor;
- echipamentele vor fi menținute în mod corespunzător, activitatea fiind documentată de proceduri;
- orice echipament defect sau care produce rezultate suspecte va fi scos din uz, clar marcat și depozitat pe cât posibil într-un spațiu exterior zonei de desfășurare a analizelor, până când va fi reparat și se va demonstra prin teste de calibrare și verificare că a atins o performanță satisfăcătoare. Laboratorul este obligat să examineze influența utilizării acestui echipament asupra rezultatelor analizelor anterioare;
- în cazul în care laboratorul utilizează echipamente care nu sunt în proprietatea și/sau controlul său, va lua toate măsurile necesare pentru a se asigura că se respectă cerințele prevăzute în standarde;
- toate consumabilele, reactivii, sunt în termen, disponibili, conservați în condiții bine definite, conform reglementărilor în vigoare, adaptate la evoluția cunoașterii științifice și datelor tehnice;
- resursele informatice utilizate pentru controlul, verificarea aparatelor sau pentru interpretarea rezultatelor trebuie autorizate și actualizate.

Trasabilitatea măsurării și calibrarea:

- programul de calibrare/verificare și de validare a echipamentelor și a materialelor de referință va fi elaborat și pus în aplicare astfel încât să asigure trasabilitatea la sistemul național a măsurărilor efectuate de laborator;
- materialele de referință sau substanțele etalon vor fi utilizate de laborator numai în scopul calibrării, dacă nu se pot prezenta dovezi obiective că performanța lor ca materiale de referință nu se invalidează prin utilizare în activitatea curentă.

Amenajarea și întreținerea instalațiilor:

- construcția și localizarea trebuie să respecte reglementările;
- amenajarea trebuie să permită izolarea activităților cu risc de contaminare pentru operator și/sau probă (evitând așadar contaminarea la interior sau la exterior);

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- trebuie să fie prevăzute spații de stocare la diferite temperaturi a materiilor prime, a reactivilor, separate de cele utilizate pentru stocare probelor. Reactivii și materiile prime toxice sau periculoase se depozitează separat, în condiții de securitate pentru personal și calitatea analizei probei, iar pe ambalajul lor trebuie să fie vizibile mențiunile: "coroziv", "iritant" sau "toxic";
- trebuie să existe proceduri scrise privind modalitatea de întreținere a laboratorului.

Securitate:
- respectarea normelor regulamentare pentru evitarea riscului de incendiu și explozie;
- instalațiile de distribuire a gazului trebuie să respecte regulamentele și să fie verificate de personal autorizat;
- substanțele inflamabile, periculoase, radioactive trebuie conservate regulamentar.

Instrumentar, echipamente:
- fiecare aparat trebuie să fie prevăzut cu o carte tehnică;
- să fie adecvat pentru analizele microbiologice efectuate;
- să fie validate, întreținute, curățate, verificate periodic (metrologic).

Minim necesar pentru laboratorul de microbiologie:
- centrifugă;
- două termostate;
- dispozitiv de anaerobioză;
- hotă cu flux laminar;
- congelator –80°C, tanc azot lichid după caz;
- microscop optic;
- microscop inversat (pentru virologie);
- micrometru optic (pentru parazitologie);
- dispozitiv de colorare a lamelor.

Materiale și reactivi:
- achiziționate din surse conforme cu normele specifice folosite;
- conservate corespunzător, conform modului de utilizare prevăzut de furnizor;
- reactivii preparați și/sau reconstituiți în laborator trebuie să poarte data preparării și cea a valabilității soluției obținute. Prepararea, respectiv reconstituirea este prevăzută în proceduri de operare sau instrucțiuni de lucru;
- toți reactivii expirați trebuie eliminați.

Mijloace informatice:
- accesul total sau parțial la date trebuie limitat la personalul autorizat. Materialul informatic trebuie protejat față de accesul extern al persoanelor neautorizate;
- modificarea programelor sau a informațiilor conținute trebuie realizată numai de persoane autorizate, iar modificările trebuie înregistrate.

Responsabilul de menținere a sistemului informatic garantează că:
- personalul implicat respectă regulile secretului profesional;
- sistemul este configurat și protejat pentru asigurarea confidențialității;
- orice modificare se realizează de personal calificat, doar la cererea responsabilului de laborator și face obiectul unui proces verbal detaliat, semnat, înregistrat și postat în arhiva laboratorului.

Eliminarea deșeurilor:
- conform legislației și reglementărilor în vigoare;
- se separă în două categorii: deșeuri cu risc și deșeuri asimilabile celor menajere;
- deșeurile cu risc sunt separate în trei grupe:
  a) potențial contaminate;
  b) produși toxici sau chimici;
  c) produși radioactivi.
- pentru fiecare din cele 3 grupe, trebuie să existe proceduri privind modalitățile specifice de condiționare, stocare, transport, tratare și pretratare sau eventual un contract cu o societate de profil pentru realizarea acestor proceduri;

BCU "CAROL I" UNIVERSITY LIBRARY

- deşeurile asimilabile celor menajere sunt depozitate în containere care intră în circuitul de eliminare al deşeurilor menajere (pentru care trebuie sî existe acordul colectivităţii locale).

Execuţia analizelor de laborator:

Laboratorul va avea proceduri de utilizare a tuturor echipamentelor relevante, instrucţiuni de manipulare şi pregătire pre-analitică a probelor şi proceduri de lucru pentru metodele care în lipsa unor asemenea precizări, ar pune în pericol corectitudinea rezultatelor.

Manualul propriu al laboratorului reprezintă o cerinţă absolut necesară pentru AC deoarece:

- menţine şi îmbunătăţeşte calitatea serviciilor laboratorului oferite pacientului şi identifică problemele rezultate din practici greşite;
- furnizează personalului instrucţiuni scrise despre efectuarea testărilor conform standardelor acceptate în laborator;
- ajută la evitarea omisiunilor care apar în execuţia testelor;
- furnizează tehnici standardizate scrise, utilizate în pregătirea personalului;
- facilitează pregătirea listelor de inventar pentru reactivi, medii şi echipamente;
- promovează practicile corecte de biosiguranţă în laborator.

Procedurile se referă la:

- curăţarea spaţiului de lucru;
- igiena personală;
- măsuri de precauţie – siguranţă (zone pentru luarea mesei şi fumat situate în afara spaţiului de lucru, manipularea şi eliminarea materialelor infectate, vaccinările corespunzătoare pentru personal, de exemplu, pentru hepatita B);
- asistenţa de rutină şi întreţinerea echipamentelor;
- prelevarea probelor;
- înregistrarea probelor;
- eliminarea probelor necorespunzatoare;
- pregătirea mediilor de cultură (indiferent dacă sunt achiziţionate gata preparate sau sunt produse în laborator din ingrediente de bază, trebuie să se asigure un stoc minim de medii care să acopere gama de analize efectuate: de exemplu o bază de agar-agar care poate fi utilizată pentru pregătirea gelozei sânge, gelozei chocolat şi a mai multor medii selective; un mediu foarte selectiv, agar *Salmonella, Shigella* sau dezoxicolat citrat şi unul mai puţin mediu selectiv, agar MacConkey, necesare pentru izolarea enterobacteriaceelor patogene din probe de materii fecale etc.; cantităţile maxime de mediu care pot fi comandate trebuie epuizate în 6 luni, sau cel mult 1 an; cantitatea totală ar trebui să fie ambalată în containere cu cantităţi ce vor fi utilizate în maxim două luni) (WHO, 2003);
- transportul probelor;
- eventualele tratamente prealabile ale probei;
- recepţia probelor;
- conservarea probelor înainte şi după analize;
- prelucrarea probelor;
- înregistrarea rezultatelor;
- raportarea rezultatelor;
- asigurarea calităţii;
- gestionarea sistemelor informaţionale eventual existente.

Toate instrucţiunile, standardele de metodă, manualele şi literatura de referinţă relevante pentru domeniul de activitate a laboratorului, vor fi menţinute la zi şi vor fi accesibile personalului de laborator.

Laboratorul va avea un sistem documentat pentru identificarea unică a probelor de analizat, pentru a preveni orice confuzie legată de identitatea acestora.

Laboratorul va avea proceduri şi facilităţi adecvate pentru a preveni deterioararea probelor în timpul depozitării, manipulării, pregătirii şi analizei. În situaţiile în care probele trebuie depozitate şi/sau pregătite în condiţii speciale de mediu, acestea vor fi asigurate, monitorizate şi înregistrate. În cazul în care o probă sau o parte dintr-o probă trebuie păstrată pentru repetarea analizelor (contra-proba), laboratorul va asigura toate condiţiile pentru păstrarea integrităţii şi securităţii acesteia.

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Unde este cazul, laboratorul va avea proceduri pentru recepția și păstrarea în siguranță a contra-probelor.

Procedurile pot avea anexe (de exemplu, fișa de înregistrare a probelor). Numărul procedurilor trebuie să fie unic, iar unele pot fi comune cu cele din alte laboratore (de exemplu, procedurile de înregistrare a reactivilor chimici, de calibrare a pipetelor și balanțelor).

Este de dorit ca toate procedurile să respecte un format unic, care sa cuprindă următoarele puncte (REMIC, 2008):

- titlu unic;
- scopul procedurii;
- procedura;
- responsabilități;
- numele autorului și al persoanei care aprobă;
- data aprobării, perioada de valabilitate, ediția.

Laboratorul va utiliza metode de analiză și proceduri de testare adecvate scopului, inclusiv pentru prelevarea probelor, manipularea, transportul, depozitarea și pregătirea lor. Performanțele metodelor de analiză vor respecta limita de detecție, precizia și acuratețea recomandate de legislația în vigoare, în domeniul apei.

Ori de câte ori este necesară utilizarea unei metode nestandardizate, se va obține acordul pacientului, iar metoda de analiză va fi documentată, validată, documentația rezultată fiind accesibilă solicitantului sau altor persoane responsabile.

Atunci când prelevarea probelor este parte integrantă a metodei de analiză, laboratorul va documenta această situație printr-o procedură specială. Dacă sunt aplicabile, se vor utiliza tehnici statistice pentru eșantionare.

Dacă se utilizează echipamente automate asistate de calculator pentru prelevarea, pregătirea, manipularea, înregistrarea, raportarea și arhivarea rezultatelor analizelor, laboratorul se va asigura că:

a) sunt îndeplinite criteriile prezentului document;
b) *soft*-ul utilizat este adecvat și documentat;
c) sunt stabilite și implementate proceduri referitoare la protejarea integrității datelor; aceste proceduri vor include cel puțin securizarea datelor introduse, prelucrate, transmise, arhivate;
d) calculatoarele și echipamentele automate vor fi menținute în stare de funcționare adecvată prin asigurarea condițiilor de mediu și de operare;
e) se vor stabili și implementa proceduri pentru menținerea securității datelor, inclusiv prin prevenirea accesului neautorizat.

Unde este cazul vor exista proceduri pentru achiziționarea, recepția și depozitarea materialelor consumabile utilizate în activitatea de laborator.

Sub-contractarea analizelor:

Sub-contractarea anumitor analize se va face doar cu un laborator cu un nivel de competență cel puțin echivalent cu al laboratorului care trimite analizele, iar pacientul va fi notificat.

Înregistrarea rezultatelor:

Laboratorul va menține un sistem de înregistrare a rezultatelor, adecvat activității sale, în concordanță cu prevederile prezentului document. Laboratorul va înregistra toate observațiile și calculele originale și o copie după buletinele de analiză pe o perioadă considerată ca adecvată. Înregistrările referitoare la fiecare analiză vor conține suficiente informații pentru a permite repetarea lor. Acolo unde este cazul, înregistrările conexe, ca de exemplu calibrările, vor fi arhivate pe o perioadă considerată adecvată.

Stocarea și conservarea arhivelor:

- rezultatele analizelor trebuie păstrate 5 ani (puse la dispoziția controalelor externe de calitate);
- procesele verbale privind măsurile luate pentru corectarea erorilor evidențiate în urma CEC – 5 ani;
- rezultatele CIC – 3 ani;
- 1 exemplar din manualul calității – 3 ani;
- contractele cu societățile de profil și documentele legate de eliminarea deșeurilor – 3 ani;
- documentația privind reactivii și consumabilele – pe durata utilizării lor;
- documentele referitoare la modificările programelor informatice;

BCU "MIHAIL KOGĂLNICEANU" UNIVERSITY LIBRARY

- arhiva trebuie depozitată într-un loc adecvat şi care să asigure confidenţialitatea datelor;
- laboratorul va avea proceduri pentru înregistrarea electronică a datelor. Dacă arhiva este informatică se iau măsuri de evitare a pierderii de informaţie (copii multiple pe CD-ROM – cel puţin două, una pentru consultări, una pentru păstrare).

Raportarea rezultatelor:

Rezultatele fiecărei analize sau serii de analize efectuate de laborator vor fi raportate cu acurateţe, clar, neambiguu şi obiectiv, în conformitate cu instrucţiunile din metoda de analiză.

Rezultatele vor fi raportate sub forma unui buletin de analiză care va include toate informaţiile necesare pentru interpretarea rezultatelor şi toate informaţiile cerute de utilizarea metodei de analiză.

Buletinul de analiză se transmite imediat ce rezultatul analizei este obţinut.

Buletinul de analiză va include cel puţin următoarele informaţii:

- titlul, de exemplu "Buletin de analiză";
- denumirea şi adresa laboratorului şi locul în care a fost efectuată analiza;
- identificarea unică a buletinului de analiză;
- unde este cazul, numele şi adresa solicitantului;
- descrierea şi identificarea neambiguă a probelor analizate;
- caracterizarea probei şi condiţiile în care aceasta a fost analizată;
- data şi ora la care proba a fost recepţionată, data şi ora la care a fost analizată;
- specificarea metodei de analiză utilizate şi descrierea neambiguă a oricărei alte metode de analiză nestandardizate utilizate;
- detalii despre procedura de prelevare a probei;
- se va menţiona orice abatere de la metoda de analiză standardizată şi orice altă informaţie relevantă, ca de exemplu condiţiile de mediu;
- măsurările, examinările şi rezultatele derivate, însoţite de tabele, grafice, schiţe sau fotografii după caz şi orice abateri constatate;
- estimarea incertitudinii în măsurare;
- semnătura şi funcţia persoanei responsabile pentru conţinutul buletinului de analiză şi data eliberării buletinului;
- unde este relevant, declaraţia "rezultatele se referă exclusiv la proba analizată";
- declaraţia "acest buletin de analiză nu va fi reprodus parţial, fără acordul scris al laboratorului";
- în cazul în care buletinul de analiză conţine rezultate ale unor analize sub-contractate, aceste rezultate vor fi clar marcate;
- se va acorda atenţie formei grafice a buletinului de analiză, astfel încât acesta să fie uşor de citit; formatul poate fi adaptat fiecărui tip de analiză, dar antetul se recomandă a fi standardizat;
- materialele adiţionale buletinului de analiză vor fi organizate într-un document separat, intitulat de exemplu "Raport suplimentar la buletinul de analiză nr....", care va primi un număr de ordine;
- laboratorul va notifica în scris, cu promptitudine, solicitantul, asupra oricărui eveniment care produce dubii asupra validităţii rezultatelor înscrise în buletinul de analiză;
- unde este cazul, laboratorul va asigura transmiterea rezultatelor către pacient, prin telefon, fax, alte mijloace electronice sau pe suport magnetic, pe baza unei proceduri care respectă prevederile în vigoare şi confidenţialitatea datelor;
- raportarea rezultatelor va respecta toate cerinţele legislaţiei în vigoare.

AUTORIZAŢIA DE DESCHIDERE A UNUI LABORATOR

Un laborator poate fi deschis doar de o persoană fizică, societate civilă profesională sau societate anonimă sau societate cu responsabilitate limitată, un organism sau serviciu de stat, de un departament, o instituţie publică, un organism mutualist sau de securitate socială, un organism cu scop nelucrativ cu utilitate publică necunoscută, care posedă o autorizaţie eliberată de MS. Şeful laboratorului trebuie să aibă o diplomă în medicină, medicină veterinară, farmacie sau o formaţie specializată, certificate de studii aprofundate, echivalenţe, derogări. Tehnicienii trebuie să aibă diplome eliberate de instituţiile aprobate de MS.

CIC se realizează în special cu **probe de referință** (materiale sau substanțe ale căror proprietăți sunt suficient de omogene și bine stabilite pentru a putea fi folosite pentru calibrarea unui aparat, evaluarea, compararea și validarea unei metode de măsurare, pentru evaluarea calității altor materiale, demonstrarea acurateții rezultatelor, monitorizarea performanțelor laboratorului (ISO Guide 30:1992). Pe cât posibil, materialele de referință trebuie utilizate în condiții adecvate (conform standardelor și recomandărilor producatorului). **Metoda de referință** este o metodă de investigare standard națională sau internațională, completă, cu acurateție și precizie demonstrate, care descrie cu claritate și exactitate condițiile și procedurile necesare pentru măsurarea uneia sau mai multor valori proprii și poate fi utilizată pentru evaluarea acurateții altor metode pentru aceeași analiză sau pentru caracterizarea unui material de referință. În laboratorul de microbiologie se controlează echipamentele (tabelul 30), mediile de cultură (tabelul 31, 32), discurile de antibiogramă, materialele de lucru, sistemele de testare automată și se asigură verificarea competențelor și performanțelor personalului (ISO 15189, ISO 17025, L53/2005 și OUG 65/2005).

Organizarea controlului intern al calității este responsabilitatea șefului de laborator de analize medicale, iar reprezentantul legal al laboratorului de analize medicale are obligația de a asigura resursele necesare îndeplinirii acestuia. CIC se efectuează zilnic, săptămânal, lunar sau ori de câte ori este nevoie. Rezultatele obținute se analizează de către specialistul responsabil de analiza respectivă, care decide acceptarea sau respingerea acestora (Ord. MSP 1301/20.07.2007). În laboratorul de microbiologie se controlează toate materialele, echipamentele și procedurile de lucru. CIC trebuie să fie practic (util), realizabil (să se poată aplica) și abordabil (costuri accesibile).

Laboratorul de microbiologie trebuie să cuprindă:

- un local de recepție;
- un birou de secretariat și arhivă;
- sală de prelevare a probelor;
- spălătorie;
- cameră pentru efectuarea propriu-zisă a analizelor.

Tabelul 30.

Controlul de calitate al echipamentelor.

Echipament	Întreținere de rutină	Monitorizare	Mentenanță tehnică și inspecție
Jar de anaerobioză	Se curăță săptămânal Se reactivează catalizatorul după fiecare utlizare (160°C, 2h). Se înlocuiește catalizatorul odată la 3 luni.	Se utilizează de fiecare dată albastru de metilen ca indicator.	Se verifică săptămânal etanșeitatea garniturilor.
Autoclav	Curățare și schimbarea apei lunar. Maxim 2 l de mediu.	Verificarea și ajustarea nivelului apei înainte de fiecare utilizare. Înregistrarea timpului și temperaturii de sterilizare la fiecare utilizare. Verificarea performanței săptămânal cu suspensii de spori de *Bacillus stearothermophilus* sau testul Bowie Dick.	Verificare o dată la 6 luni
Centrifugă	Ștergerea pereților interiori cu antiseptic săptămânal sau în caz de contaminare.		Înlocuirea anuală a periilor.
Etuvă	Curățarea interiorului o dată pe lună.	Înregistrarea timpului și temperaturii de sterilizare la fiecare utilizare.	Verificare o dată la 6 luni.
Incubator	Curățarea interiorului și a rafturilor o dată pe lună.	Înregistrarea temperaturii la începutul zilei (35 +/- 1°C).	Verificare o dată la 6 luni.
Microscop	Ștergerea lentilelor cu material textil sau hârtie specială în fiecare zi. Curățarea părții mecanice o dată pe săptămână. Acoperire pentru protejarea de praf.	Verificarea alinierii condensorului o dată pe lună.	Verificare anuală.
Frigider	Curățare și decongelare o dată la 2 luni și după pană de curent.	Înregistrarea temperaturii în fiecare dimineață (2-8°C).	Verificare o dată la 6 luni.
Baie de apă	Curățarea interiorului și schimbarea apei o dată pe lună.	Verificare zilnică a nivelului apei. Înregistrarea temperaturii în prima zi din fiecare săptămână.	Verificare o dată la 6 luni.
Hota bacteriologică	Dezinfecție și curățire săptămânală.	Înregistrarea presiunii aerului la fiecare deschidere.	Verificare anuală.
Deionizator de apă		Zilnic - citirea rezistivității. Săptămânal- culturi pentru testarea microbiologică.	
Pipete automate			Verificare bianuală.

BCU IAȘI CENTRALA UNIVERSITARĂ

Mediile de cultură

Mediile de cultură pot fi preparate în laborator din ingredientele de bază sau din pulberi deshidratate disponibile în comerț, sau pot fi achiziționate gata de utilizare.

Pulberile deshidratate comerciale sunt recomandate, deoarece se pot transporta și stoca ușor, iar calitatea este potențial mai bună decât a celor preparate în laborator din ingrediente. Acestea trebuie însoțite de certificate de calitate, care să ateste performanțele privind creșterea și supraviețuirea microorganismului țintă și inhibarea sau supresarea creșterii altor microorganisme.

Calitatea mediilor depinde de **calitatea materialelor utilizate pentru obținerea lor**, în special de **calitatea apei** (concentrația în ioni de Ca nu trebuie să depășească o anumită valoare, deoarece Ca are efect inhibitor asupra creșterii microorganismelor, conductivitatea < 15 μS și valoarea pH nu mai mică de 5,5) și **calitatea placilor Petri** (se utilizează numai plăci din plastic borosilicat care nu eliberează alkali în mediu, iar limita maximă admisă de reziduu toxic de EtO (etilenoxid) este de 1 μg/g). Pentru rehidratarea mediilor deshidratate se va folosi apa demineralizată, distilată sterilă.

Controlul calității aditivilor este de asemenea foarte important.

Controlul sterilității sângelui se realizează în două etape:

1) Testarea inițială (se înregistrează în registrul de control: specia animală de la care a provenit lotul de sânge, numărul lotului și data expirării, se scoate steril cu o seringă o cantitate de 2,5 ml și se însămânțează într-un flacon de hemocultură care se incubează, iar flaconul original se refrigerează):

- dacă proba de control se pozitivează este anunțat responsabilul de calitate, se face colorație Gram, se face subcultivare pe geloză sânge, se identifică specia contaminantă și se scoate din uz flaconul cu sânge;
- dacă proba de control este negativă, sângele se introduce în lucru pentru prepararea mediilor cu sânge.

2) Testarea finală (câteva picături din flaconul utilizat se cultivă pe o placă de mediu cu sânge, se incubează la 35°C, 48 ore, apoi la temperatura camerei încă 48 ore, iar rezultatul se înregistrează în registrul de control al mediilor cu sânge).

Mediile preparate trebuie controlate vizual privind caracteristicile fizice: prezența neregularităților și a bulelor de aer, grosimea (optimă 4.0 ± 0.2 mm) neuniformă a stratului de mediu repartizat în placă, uscarea sau deshidratarea mediului, înghețarea sau cristalizarea acestuia în placă.

Mediile trebuie alese conform analizelor efectuate. Unele pot avea utilizări foarte diverse, altele foarte speciale. De exemplu o bază de agar este utilizată pentru prepararea gelozei sânge, gelozei chocolat și a mai multor medii selective. Un mediu înalt selectiv (agar-*Salmonella Shigella* sau dezoxicolat citrat agar) și unul mai puțin selectiv (agar MacConkey) sunt necesare pentru izolarea enterobacteriilor patogene din probe de materii fecale. Pentru izolarea *Campylobacter* spp. este necesar un mediu special (WHO, 2003).

Se comandă de obicei cantitățile de medii care vor fi folosite timp de 6 luni, sau cel mult 1 an.

Cantitatea totală ar trebui să fie ambalată în containere care vor fi utilizate maxim în 1–2 luni.

La recepția mediilor, se asigură că recipientele sunt bine închise. Deoarece mediile deshidratate pot absorbi apa din atmosferă după ce sunt depozitate într-un mediu cu umiditate ridicată, capacele se izolează cu ceară de parafină.

Se notează data primirii pe fiecare recipient.

Se depozitează la întuneric, loc răcoros, bine ventilat.

Se rotește stocul, astfel încât materialele mai vechi să fie utilizate primele.

Se notează data deschiderii recipientului.

Se aruncă mediile deshidratate întărite sau care și-au schimbat culoarea.

Se ține o evidență scrisă a stocului de medii.

Stocarea mediilor de cultură

Mediile se păstrează la loc ferit de lumină și căldură.

Mediile care conțin sânge, alte lichide organice sau antibiotice se păstrează la frigider (mediile repartizate în tuburi cu dopuri de vată/ tifon, timp de 2–3 săptămâni, cele cu capac cu filet, 3 luni, iar mediile rapartizate în plăci Petri, 4 săptămâni).

Acuratețea compoziției mediilor, diluenților și fluidelor de suspensie, preparate în laborator, trebuie verificată în ceea ce privește asigurarea supraviețuirii organismului țintă, inhibarea sau

supresia creşterii altor organisme, proprietăţile biochimice (medii diferenţiale, speciale) şi proprietăţile fizice (pH, volum şi sterilitate) (EA - 4/10).

Controlul calităţii mediilor preparate (tabelul 32, 33)

1. **Testarea pH.** Valoarea pH a mediului preparat nu trebuie să fie verificată atunci când este corect preparat din mediu deshidratat. În schimb, verificarea este necesară în cazul în care mediul este preparat din ingrediente de bază. Mediul trebuie lăsat să se răcească înainte de testarea pH. Mediile solide ar trebui testate cu un electrod de suprafaţă sau după macerare în apă distilată. Dacă pH diferă cu mai puţin de 0,2 unităţi faţă de cel din caietul de sarcini, acesta se ajustează cu soluţie de acid sau respectiv, soluţie bazică.

2. **Controlul sterilităţii.** Se recomandă atunci când la baza solidă se adaugă componente precum sângele, după autoclavare. Se prelevează 3–5% din fiecare lot şi incubează la 35°C, timp de 2 zile. Restul se păstrează la frigider. Dacă pe placă apar mai mult de două colonii, se aruncă întregul lot.

3. **Testarea performanţelor de creştere microbiană (CLSI M22-A2. CLSI M22-A3).** Laboratorul trebuie să deţină întotdeauna un set proaspăt de tulpini de referinţă (selectate dintre tulpinile de lucru, sau obţinute din surse comerciale sau oficiale) pentru monitorizarea performanţei mediilor de cultură:

- se prepară o suspensie de densitate McFarland 0.5 (10^7–10^8 UFC/mL) sau cu absorbanţa de 0.08–0.1 măsurată la 625 nm;
- se incubează pe durata de timp recomandată în mod curent pentru mediul respectiv;
- se citesc plăcile;
- se ţine o evidenţă corectă a rezultatelor.

Evaluarea creşterii microorganismelor se realizează prin metode relative (mărimea coloniilor, caracteristicile coloniilor) sau obiective (metoda ecometrică, metoda proporţiilor).

Tabelul 31.

Tulpini de referinţă recomandate pentru controlul mediilor (WHO, 2003).

CGP	Enterobacterii	Bacterii Gram negative fastidioase
Enterococcus faecalis (ATCC 29212)	*Citrobacter freundii*	*Moraxella catarrhalis,*
S. aureus (ATCC 25923)	*Enterobacter cloacae*	*H. influenzae* tip b
S. epidermidis	*K. pneumoniae*	beta-lactamază-negativ
Str. agalactiae	*Proteus mirabilis*	beta-lactamază-pozitiv
Str. mitis	*E. coli* (ATCC 25922)	*H. parainfluenzae*
S. typhimurium	*Serratia marcescens*	*N. gonorrhoeae*
Str. pneumoniae	*Sh. flexneri*	*N. meningitidis*
Str. pyogenes	*Yersinia enterocolitica*	
Fungi	**Alţi BGN**	**Anaerobi**
C. albicans	*Acinetobacter lwoffi*	*Bacteroides fragilis*
	Ps. aeruginosa (ATCC 27853)	*Cl. perfringens*
	V. cholerae (non-01)	

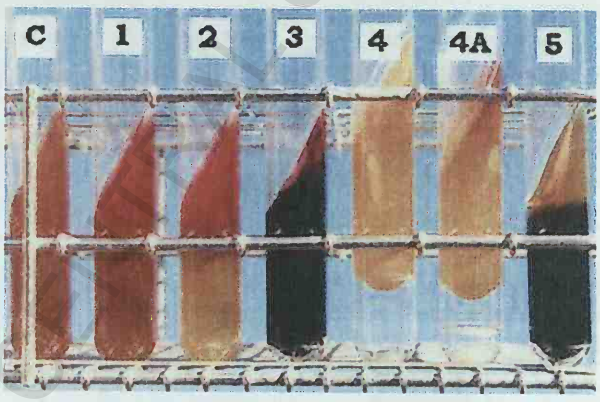
Tabelul 32.

Teste de performanţă realizate pe mediile uzuale (WHO, 2003).

Mediu	Tulpina testată	Prezenţa creşterii/aspectul coloniilor sau mediului
Agar bilă esculină 24h	*Enterococcus faecalis*	Da/înnegrirea mediului
	Streptococcus α-hemolitic	Nu
Geloză sânge, 24h, CO2	*Str. pyogenes*	Da/ β-hemoliză
	Str. pneumoniae	Da/ α-hemoliză
Geloză chocolat, 24h, CO2	*H. influenzae*	Da
Decarboxilaze Lizină 48h	*S. typhimurium*	+
	S. flexneri	–
Ornitină 48h	*S. typhimurium*	+
	K. pneumoniae	–
Arginin-dihidrolază 48h	*S. typhimurium*	+
	Proteus mirabilis	+
Gelatinază 24h	*E. coli*	–
	Serratia marcescens	+
TSI (porţiunea dreaptă de min. 2.5 cm) (fig. 322)	*S. typhimurium*	Pantă roz, gaz + H_2S
	S. flexneri	Pantă roz, gaz
	A. lwoffi	Mediu nemodificat
	Citrobacter freundii	Pantă galbenă, gaz + H_2S

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

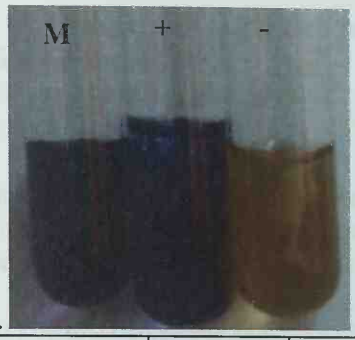
MacConkey cu cristal violet 24h	*E. coli*	Colonii roşii
	P. mirabilis	Colonii incolore, neinvazive
	E. faecalis	–
Malonat -24h	*E. coli*	• (verde)
	K. pneumoniae	+ (albastru)
Agar Manitol Sare 24h	*S. aureus*	Colonii galbene
	S. epidermidis	Colonii roşii
	E. coli	–
Roşu metil/Voges–Proskauer 48h	*E. coli*	+/–
	K. pneumoniae	–/+
Agar Mueller–Hinton 24h	*E. coli* ATCC 25922	Zone de inhibiţie corespunzătoare
	S. aureus ATCC 25923	
	Ps. aeruginosa ATCC 27853	
Bulion cu nitrat 24h	*E. coli*	+
	Acinetobacter lwoffi	–
Oxidare/fermentaţie 24h	*Ps. aeruginosa*	Oxidare la suprafaţă
Dextroză	*A. lwoffi*	Nici o modificare
Apă peptonată (indol) 24h	*E. coli*	+
	K. pneumoniae	–
Fenilalanin -dezaminază /24h Cu $FeCl_3$	*E. coli*	–
	P. mirabilis	+
Agar *Salmonella–Shigella* 24h	*E. coli*	–
Dezoxicolat citrat agar 24h	*S. typhimurium*	Colonii incolore
	Y. enterocolitica	Colonii incolore
	S. flexneri	Colonii incolore
Bulion selenit 24h	*S. typhimurium*	Creştere după subcultivare
	E. coli	–
Citrat Simmons 48 h	*E. coli*	–
	K. pneumoniae	+, albastru
Tiosulfat citrat săruri biliare 24h	*Vibrio* spp.	Colonii galbene
Agar Thayer–Martin 24h, CO_2	*N. meningitidis*	+
	N. gonorrhoeae	+
	Staphylococcus spp	–
	E. coli	–
	Candida	–
Bulion tioglicolat 24h	*Bacteroides fragilis*	+
Uree 24h	*E. coli*	–
	P. mirabilis	+ (roz)



A.

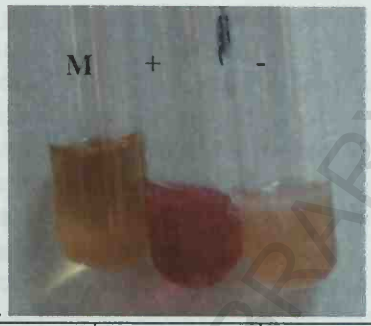
Tub neînsămânţat	1	2	3	4 4A- uşoară realcalinizare a pantei produsă de microorganismele negative pentru testul roşului de metil	5
Dezaminarea aminoacizilor (alcalinizarea pantei)	+	+	+	+	+
Fermentarea glucozei	–	+	+	+	+
Fermentarea lactozei	–	–	–	+	+
Fermentarea zaharozei	–	–	–	+	+
Gaz din glucoză	–	–	–	+	–+
Producerea H_2S	–	–	+	–	+
Exemple	*Pseudomonas* *Alcaligenes* *Acinetobacter* Alţi bacili Gram negativi non enterici	*Morganella, Providencia, Shigella*	*Citrobacter, Salmonella, Proteus, Edwardsiella*	*E. coli, Enterobacter, Klebsiella*	*Citrobacter* H_2S+, *E. coli* H_2S+ *Salmonella* lactozo+

BCU IASI / UNIVERSITY LIBRARY



B.

Tub neînsămânțat		
Mobilitate	+	–
LDC	+	–
FAD	–	–
Exemple	*E. coli*	*Shigella flexnerii*



C.

Tub neînsămânțat		
Mobilitate	+	+
Urează	+	–
Indol	–	–
Exemple	*Proteus sp.*	*Salmonella sp.s*

Fig. 322. Sisteme multitest utilizate pentru evidențierea caracterelor biochimice ale microorganismelor: A. Mediu TSI însămânțat cu diferite specii de enterobacterii; B. Mediu MILF (mobilitate, indol, LDC, FAD); C. Mediu MIU (mobilitate, indol, urează).

Tabelul 33.

Surse de neconformitate privind calitatea mediilor de cultură.

Nr. crt.	Neconformitate	Sursa
1.	Agar nesolidificat corespunzător	Depășirea temperaturii de sterilizare, pH scăzut care poate determina hidroliza acidă a agarului, eroare de cântărire a ingredentului, omogenizare insuficientă, calitate necorespunzătoare a agarului.
2.	pH incorect	Sticlărie contaminată chimic, apă impură, supraîncălzirea mediului la sterilizare, pH măsurat la o temperatură neadecvată, deteriorarea mediilor deshidratate.
3.	Culoare necorespunzătoare sau nuanță mai închisă	Apă impură, sticlărie murdară, pH necorespunzător, supraîncălzirea mediului la sterilizare, deteriorarea mediilor deshidratate.
4.	Apariția de precipitate	Supraîncălzirea mediului la sterilizare, apă impură, sticlărie contaminată, deteriorarea mediilor deshidratate.
5.	Inhibarea dezvoltării microorganismelor/creștere redusă/selectivitate redusă	Supraîncălzirea mediului la sterilizare, deteriorarea mediilor deshidratate, sticlărie sau apă contaminate, erori de cântărire a ingredientelor și de omogenizare a acestora.

Controlul coloranților și reactivilor

Laboratorul trebuie să se asigure că toți reactivii (inclusiv soluțiile stoc), mediile, diluenții și alte fluide de suspensie sunt corect etichetate, indicând cu exactitate identitatea produsului, concentrația, condițiile de păstrare, date privind prepararea, date privind valabilitatea/perioada de păstrare recomandată (EA – 4/10).

Testarea (tabelul 34) trebui să fie efectuată:

- de fiecare dată când este preparat un nou lot de soluție de lucru;
- în fiecare săptămână (periodicitatea este critică pentru coloranția Ziehl-Neelsen la rece, în timp ce coloranții utilizați în metoda clasică prezintă o stabilitate de câteva luni).

Coloranții și reactivii trebuie aruncați atunci când:

- a fost atinsă data de expirare;
- apar semne vizibile de deteriorare (turbiditate, precipitate, modificări de culoare).

Tabelul 34.

Controlul reactivilor de laborator (după WHO, 2003).

Reactiv de testat	Control pozitiv	Control negativ	Mediu
Bacitracina	*Str. pyogenes (inhibiție)*	*E. faecalis*	Geloză sânge
Catalaza	*S. aureus*	*E. faecalis*	TSA
Coagulaza	*S. aureus*	*S. epidermidis*	TSA
b-Glucuronidază, PGUA- *acid* 4-Nitrofenil-b-D-glucopiranosiduronic	*E. coli*	*K. pneumoniae*	TSA
Coloranția Gram	*Staphylococcus* spp	*E. coli*	Frotiu mixt
ONPG – Ortonitrofenil β+D galactopiranozid	*E. coli*	*S. typhimurium*	TSI
Optochin	*Str. Pneumoniae (inhibiție)*	*Str. mitis*	Geloză sânge
Oxidază	*Ps. aeruginosa*	*E. coli*	TSA
Telurit	*E. faecalis*	*Str. agalactiae*	Geloză sânge
Factor V	*H. parainfluenzae (creștere)*	*H. influenzae*	TSA
Factori XV	*H. influenzae (creștere)*		TSA
Ziehl–Neelsen	*M. tuberculosis*		Frotiu mixt

UMF IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Controlul antigenelor de diagnostic şi al antiserurilor:

- se urmează totdeauna instrucţiunile producătorului;
- se păstrează reactivii la temperatura recomandată. Unii reactivi serologici nu tolerează congelarea;
- se evită congelarea şi decongelarea repetate;
- înainte de congelare, antiserul se distribuie în porţiuni mici, suficiente pentru câteva teste;
- pentru aglutinarea bacteriană se folosesc totdeauna culturi proaspete şi pure;
- serurile recoltate de la acelaşi pacient, în timpul fazei acute şi convalescenţei, trebuie testate cu acelaşi lot de reactivi;
- pentru diagnosticul serologic al sifilisului, trebuie utilizate exclusiv proceduri recunoscute la nivel naţional sau internaţional;
- fiecare lot de teste serologice trebuie să includă:
  - ♦ un ser negativ (pentru controlul specificităţii);
  - ♦ un ser slab pozitiv (pentru controlul sensibilităţii);
  - ♦ un ser pozitiv cu titru înalt (pentru controlul tritrului);
- se înregistrează totdeauna valorile titrurilor serului de control.

Controlul testării sensibilităţii la antibiotice (antibiograma)

Testarea sensibilităţii la antibiotice este reglementată de o serie de standarde: CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), DIN (*Deutsches Institut fiir Normung*), BSAC (*British Society for Antimicrobial Chemotherapy*), SRGA (*Swedish Reference Grup for Antibiotics*), SFM (*Société Française de Microbiologie*), EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, înfiinţat din 1996).

Tulpinile standard de control pentru antibiogramă sunt: *S. aureus* (ATCC 25923; NCTC 6571); *E. coli* (ATCC 25922; NCTC 10418) şi *Ps. aeruginosa* (ATCC 27853; NCTC 10622), la care se adaugă *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *H. influenzae* (ATCC 49247), *Str. pneumoniae* (ATCC 49619) (CLSI, 2010).

Testele ar trebui să fie efectuate cu cele trei tulpini standard atunci când un nou lot de discuri sau de mediu este pus în folosinţă, respectiv o dată pe săptămână, în paralel cu antibiograma de rutină sau de fiecare dată când se obţin diametre în afara limitelor admise pentru tulpinile de referinţă:

- pentru antibiograma tulpinilor bacteriene fără exigenţe nutritive se utilizează întodeauna mediul Müller-Hinton, care se testează cu tulpina de referinţă *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, şi discuri de SXT şi sulfonamidă;
- corectarea valorii pH (7.2–7.4) este obligatorie, deoarece este esenţială pentru activitatea unor antibiotice;
- inoculul trebuie standardizat prin comparare cu standardul de turbiditate MacFarland 0.5 sau cu ajutorul densitometrului;
- discurile se testează cu ajutorul tulpinilor de referinţă (discurile se păstrează la +4°C, cu excepţia β-lactamicelor care se păstrează la –20°C);
- zonele de inhibiţie trebuie măsurate cu atenţie şi raportate la tabelele cu diametre critice, iar pentru fiecare dintre tulpinile de referinţă, acestea trebuie să se încadreze în limitele prevăzute; citirea zonelor de inhibiţie obţinute pentru tulpinile de referinţă se înregistrează în Registrul de Control Discuri şi nu este admisă mai mult de o eroare la 20 de testări consecutive sau de 3 abateri la 30 de testări consecutive, depăşirea acestei limite necesitând instituirea măsurilor corective şi retestarea unei alte serii de 20 de încercări; după instituirea unor acţiuni corective; pentru testările săptămânale, controlul tulpinilor se efectuează 5 zile consecutiv, pentru fiecare combinaţie microorganism – antibiotic, cele 5 rezultate trebuind să fie cuprinse în limitele admise, iar dacă rezultatele sunt în afara limitelor, pentru acurateţea şi precizia controlului, se reia testarea zilnică timp de 30 zile.

Tulpina de referinţă este definită ca orice microorganism caracterizat la nivel de gen şi specie, clasificat şi descris conform caracteristicilor şi originii (ISO 11133–1:2009) obţinut dintr-o colecţie recunoscută la nivel naţional sau internaţional.

Cultura de referință este termenul general utilizat pentru culturi de referință, stocuri de referință şi culturi de lucru.

O cultură stoc de referință este obținută prin pregătirea microorganismului dintr-un tip de cultură de colecție (se păstrează la –70°C în TCB/Trisodium Citrat Glicerol).

Cultura stoc este reprezentată de un set de culturi identice separate, obținute printr-o singură subcultură dintr-o tulpină de referință (ISO 11133–1:2009). Cu 24 de ore înainte de testare, din cultura stoc, printr-un pasaj, se obține **cultura de lucru**, care se înlocuieşte lunar prin subcultivare din cultura stoc şi se păstrează la 4–8°C în agar înclinat TSB/Geloză Chocolat pentru Haemofili.

Subcultura sau pasajul reprezintă transferul microorganismelor pe un mediu proaspăt, adecvat creşterii. Creşterea unei culturi de referință sau a unei culturi stoc de referință din starea sa de conservare (înghețată sau liofilizată) nu reprezintă o subcultură.

Întreținerea şi utilizarea culturilor stoc

Tulpinile de referință se selectează astfel încât un număr minim de tulpini să permită testarea unui număr cât mai mare de caractere morfologice, metabolice şi serologice. Acestea pot proveni din diferite produse patologice, dar însoțite obligatoriu de o fişă de identificare corespunzătoare, din colecții oficiale, de la furnizori comerciali, din controale externe de evaluare a calității sau de la laboratoare de referință.

Conservarea pe termen lung se recomandă să fie realizată prin liofilizare sau depozitare la –70°C sau în azot lichid. Alternativa la aceste metode este stocarea în glicerol la –20°C. În scopul conservării, se obține o cultură pură pe un mediu solid adecvat, din care se recoltează o ansă plină care se suspendă în mediul de conservare, reapartizat în criotuburi, în volume de 1–2 ml. Se evită decongelările şi congelările succesive, şi se transferă după 12–18 luni.

Conservarea se poate realiza şi la temperatura camerei, după obținerea culturilor pure pe medii repartizate în pantă (BHI – *broth heart infusion* cu adaos de sânge proaspăt sau tratat termic, pentru conservarea microorganismelor fastidioase), şi acoperirea culturii cu ulei de parafină steril sau pe mediu TSA repartizat în tuburi, în coloană dreaptă, însămânțat prin înțepare. Se transferă după 6–12 luni.

Pentru *Neisseria* şi pentru streptococi se foloseşte mediul CTA (*cystine trypticase agar*), repartizat drept în tuburi, însămânțat prin înțepare şi păstrat la 35°C pentru *Neisseria* şi la temperatura camerei pentru streptococi. Transferul se realizează la fiecare 2 săptămâni pentru *Neisseria* şi la o lună pentru streptococi.

Tulpinile de anaerobi se conservă prin aceeaşi metodă pe mediu *cooked-meat agar,* păstrat la temperatura camerei, iar transferul se recomandă la 2 luni.

Conservarea pe termen scurt

Culturile de lucru pentru testele de zilnice pot fi preparate astfel:

- **Microorganismele cu creştere rapidă/streptococi**
  - se inoculează pe TSA /geloză sânge – repartizat înclinat în tuburi cu dop filetat;
  - se incubează peste noapte la 35°C;
  - se păstrează la frigider şi se transferă la fiecare 2 săptămâni.
- **Meningococi şi *Haemophilus***
  - se inoculează pe geloză repartizată înclinat sau în plăci;
  - se incubează peste noapte la 35°C;
  - se păstrează la temperatura camerei şi se transferă de 2 ori pe săptămână.
- **Gonococci**
  - se inoculează pe geloză repartizată înclinat sau în plăci;
  - se incubează peste noapte şi se păstrează la 35°C;
  - se transferă la fiecare 2 zile;
  - tulpina de referință se poate înlocui cu una proaspăt izolată.

Trimiterea probelor la laboratoarele de referință

Se recomandă trimiterea probelor la laboratoare de referință în următoarele situații:

- probe rar solicitate sau teste extrem de specializate (de exemplu, virologie, serodiagnosticul infecțiilor parazitare);
- eşantioane în duplicat pentru verificarea rezultatelor proprii;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- probe care necesită confirmare sau tipizarea unor agenți patogeni de mare importanță pentru sănătatea publică (de exemplu, *Salmonella sp., Shigella sp., V. cholerae, Brucella sp.*, meningococ şi pneumococ);
- laboratoarele de referință ar trebui să fie în măsură să furnizeze culturi de referință pentru controlul calității, seruri standard şi reactivi şi să răspundă nevoilor de instruire;
- în cazul în care nu există un program de control extern de calitate, laboratorul de referință poate fi solicitat să furnizeze culturi şi probe de control laboratoarelor.

Controlul extern al calității (CEC)

Scopurile CEC (numit şi test de proficiență) sunt:

- să ofere o asigurare atât medicilor, cât şi publicului larg privind calitatea unui laborator; să furnizeze analize de bună calitate;
- să evalueze şi să compare performanțele laboratoarelor la scară națională;
- să identifice erorile frecvente;
- să încurajeze utilizarea unor proceduri standardizate şi uniformizate, utilizarea reactivilor standard;
- să ia măsuri administrative (care pot include revocarea licenței de operare) în cazul laboratoarelor care nu corespund;
- să stimuleze punerea în aplicare a programelor interne de control al calității.

Organizarea CEC

Un program de evaluare a calității constă din distribuirea unor eşantioane codificate laboratoarelor participante, care trebuie să trateze şi să manipuleze proba ca pe una de rutină.

Supravegherea trebuie să includă:

- o periodicitate de cel puțin de 4 ori pe an;
- un minim de 3 probe analizate la fiecare participare;
- perioada de raportare trebuie să fie limitată, de exemplu 2 săptămâni de la primirea probelor;
- instrucțiunile şi formularele de raportare trebuie să însoțească probele trimise.

Culturile

Culturile bacteriene care trebuie identificate şi testate pentru sensibilitate la antibiotice pot fi pure sau mixte şi trebuie să corespundă la cel puțin 3 din următoarele situații:

- Specii bacteriene de mare importanță pentru sănătatea publică, dar care sunt rareori izolate în practica de rutină, de exemplu *C. diphtheriae, S. paratyphi A* (*Brucella sp.* şi *S. typhi* nu pot fi utilizate ca probe în schemele CEC, datorită riscului de infecții grave accidentale);
- Biotipuri normale, adesea identificate greşit, de exemplu, *E. coli* H_2S-pozitivă, *E. coli* lactozo-negativă, *Proteus* urează-negativă;
- Specii nou recunoscute ca patogene sau patogeni oportunişti, de exemplu, *Yersinia enterocolitica,*
- *Vibrio parahaemolyticus, Burkholderia cepacia, Pseudomonas sp.*;
- Un amestec de *Shigella sp., Citrobacter sp., E. coli, Klebsiella* sp. pentru testarea competenței unui laborator de a izola microorganismele patogene dintr-o probă contaminată cu microorganisme comensale;
- Un amestec de organisme nepatogene pentru testarea competenței unui laborator de a recunoaşte eşantioanele negative;
- Bacteriile cu profiluri de rezistență deosebite, de exemplu, *S. aureus* meticilino-rezistent (MRSA).

Seruri

Schemele de CEC trebuie să cuprindă teste serologice pentru diagnosticul sifilisului, rubeolei şi brucelozei, infecțiilor streptococice şi febrei tifoide.

Raportarea rezultatelor

După primirea rapoartelor, rezultatele sunt analizate, iar raportul de analiză este trimis laboratoarelor în termen de o lună cu acordarea unui anumit calificativ. Fiecare laborator va avea alocat un cod, astfel încât îşi va putea analiza rezultatele în comparație cu celelalte laboratoare participante, cu respectarea confidențialității.

STAT UNIVERSITY LIBRARY

Prelevarea şi transportul produselor patologice

În microbiologia clinică, scopul examinării eşantioanelor de ţesuturi, lichide sau secreţii este de a izola şi de a identifica microroganismele patogene şi de a determina sensibilitatea lor la antibiotice. Faza preanalitică este foarte importantă pentru succesul analizei microbiologice şi depinde de foarte mulţi factori:

- corectitudinea recoltării probei;
- stabilirea gradului de urgenţă a analizei;
- precizarea scopului analizei: pentru diagnostic, alegerea tratamentului, control post-terapeutic, controlul microbiotei comensale etc.;
- preocuparea pentru cercetarea unui anumit agent patogen;
- evaluarea stării fiziologice a bolnavului;
- considerarea noţiunii de sejur tropical;
- cunoaşterea tratamentului anterior, mai ales cu antibiotice;
- evaluarea riscului unei infecţii cu agenţi periculoşi (rezistenţi la antibiotice, înalt epidemiogeni, ca *M. tuberculosis, Brucella sp., Shigella sp.*, meningococ, hepatita virală).

Calitatea eşantioanelor de produs patologic influenţează în mod decisiv calitatea analizei efectuate. Probele trebuie prelevate fără contaminare exterioară, cu minimum posibil de microbiotă comensală şi, obligatoriu, înainte de tratamentul cu antibiotice. Situsul de recoltare poate fi şi poarta de intrare sau calea de ieşire a microorganismelor (fistulă/drenaj). În cazul leziunilor profunde, se recomandă recoltarea probei cât mai aproape de focarul infecţios. Dacă nu este posibilă întreruperea tratamentului cu antibiotice, se recomandă recoltarea probelor în mediu lichid pentru diluarea antibioticului, astfel încât acesta să ajungă la concentraţii subinhibitorii.

Eşantioanele trebuie:

- trimise cât mai repede posibil în laborator (15-30 min. – 2 h), utilizând medii de transport corespunzătoare care să asigure supravieţuirea agentului patogen şi să împiedice proliferarea contaminanţilor;
- etichetate şi introduse în recipiente închise ermetic, la temperaturi de 2-8°C, pentru a evita proliferarea intensă a microbiotei comensale;
- însoţite de date clinice (situl anatomic de recoltare, natura probei, condiţiile de recoltare, contextul fiziopatologic, clinic, epidemiologic, tratament, noţiunea de deficit imunitar);
- în cantitate suficientă pentru realizarea unei analize complete (în cazul leziunilor cronice, există un număr mic de microorganisme care nu pot fi identificate nici pe frotiu şi nici în cultură şi care necesită cantităţi mari de probă – hemocultură, lichide de puncţie, biopsii).

Metodele de prelevare depind de tipul de agenţi patogeni care pot infecta anumite zone şi de tipul de leziune şi suspiciunea diagnosticului etiologic care poate interzice folosirea unor metode invazive, în scopul diminuării riscului de diseminare a infecţiei; de exemplu, recoltarea cu tamponul se face numai pentru probele de pe tegumente şi mucoase, nefiind recomandat pentru alte tipuri de probe din cauza volumului mic de probă recuperat şi a riscului de desicare şi de contaminare. Se recomandă prelevarea a două probe, una pentru microscopie şi una pentru cultură. Trebuie precizat de asemenea, dacă au fost prevăzute probe şi pentru alte examene (citologic, histopatologic, imunologic, biochimic) sau dacă repartizarea lor se face în laborator. Trebuie evitată contaminarea pentru că, prin multiplicare, levurile şi bacteriile comensale pot inhiba bacteriile patogene şi pot fi considerate în mod eronat ca patogeni oportunişti. În mod particular, problema contaminării se pune în cazul hemoculturilor, prelevatelor din tractul respirator, din sfera ORL, oculare, intestinale, genito-urinare, cutanate, subcutanate. S-au depistat metode de prelevare din situri profunde care să evite contactul cu mucoasele colonizate de microbiotă endogenă.

Conservarea probelor trebuie să evite desicarea (mai ales în cazul bacteriilor fragile – *H. influenzae, N. menigitidis, N. gonorrhoeae)* şi multiplicarea.

Sursele de eroare sunt:

- recoltarea probei în timpul tratamentului cu antibiotice, aplicarea antisepticelor locale înainte de recoltarea probei;

- utilizarea unei soluții cu antibiotice pentru recoltarea probei;
- transportul sau stocarea necorespunzătoare a probelor până la analiză;
- utilizarea unui mijloc de transport necorespunzător;
- dificultatea recoltării (care împiedică obținerea unei probe reprezentative pentru procesul infecțios);
- contaminarea probelor;
- dificultatea de a distinge o simplă colonizare de o infecție veritabilă cu patogeni oportunişti.

Condiții în care se poate refuza o probă:

- probă neetichetată corespunzător;
- recipiente deschise, sparte etc.;
- probe vizibil contaminate;
- probe recoltate de mai mult de 2 ore fără să fie conservate corespunzător;
- probe neadecvate pentru analiza prescrisă.

Însămânțarea probei trebuie să se facă imediat, pe medii corespunzătoare (îmbogățite şi selective). Mediile vor fi alese în funcție de scopul urmărit care poate fi:

- cercetarea, numărarea şi identificarea tututor microoganismelor dintr-un sit anatomic, patogene sau nepatogene; această abordare se recomandă pentru siturile anatomice sterile în mod normal (LCR, lichide de puncție, sânge, țesut).
  - în acest caz se utilizează mediu îmbogățit care să permită creşterea tuturor microorganismelor prezente, de exemplu, în cazul supurațiilor profunde, de tipul abceselor primare sau secundare cu disfuncție hematogenă şi cu origine într-un sit superficial (antrax, traumatisme, prezența de catetere, arsuri) sau suprainfecții chirurgicale, localizări viscerale (ficat, plămâni, creier şi rinichi) sau seroase (peritonite, pericardite, pleurezii, artrite) însoțite sau nu de bacteriemie;
- abordarea prelevatelor nesterile „invadate" de microoganisme comensale sau saprobionte (piele, cavitate bucală, căi aeriene, tub digestiv, mucoasa genito-urinară, mediu ambiant) presupune utilizarea mediilor de cultură selective, care să favorizeze creşterea şi multiplicarea agenților infecțioşi, să limiteze multiplicarea microoganismelor comensale prezente în probă.

În unele cazuri, analiza microbiologică are drept scop detectarea portajului cronic sau a persistenței microoganismelor, în vederea prevenirii sau controlului diseminării la alți indivizi receptivi, de pildă, detectarea portajului de *Str. agalactiae* la viitoarele mame pentru prevenirea unei infecții neonatale, detectarea bacteriilor multirezistente la antibiotice cu risc epidemiologic, de exemplu enterobacterii producătoare de β-lactamaze de spectru larg, *S. aureus* rezistent la meticilină, *Str. pneumoniae* rezistent la penicilină şi macrolide, *Enterococcus faecium/faecalis* rezistent la vancomicină şi aminoglicozide.

Modificarea microbiotei comensale poate fi de asemenea obiectul analizei microbiologice în anumite contexte epidemice bine definite.

15.2. Probe recoltate în scopul analizei microbiologice

O probă este adecvată dacă eşantionul analizat se dovedeşte reprezentativ pentru statutul microbian prevalent la nivelul zonei anatomice din care se realizează prelevarea (tabelul 35).

SÂNGELE

Analiza bacteriologică a sângelui se numeşte *hemocultură*. Este indicată pentru diagnosticul septicemiei, bacteriemiei şi în orice tablou infecțios sever (endocardite, meningite, pneumopatii, febră la pacienții neutropenici, febră prelungită, orice hipertermie peste 38,5°C).

Momentul prelevării trebuie să fie cât mai timpuriu posibil în cazul unui tablou infecțios sever sau în timpul frisonului. Caracterul intermitent al febrei necesită repetarea hemoculturii.

Situl anatomic este vena plicii cotului, jugulară, fontanelă (la nou-născut) sau lumenul cateterului vascular. Antisepsia este esențială şi se asigură cu un antiseptic cu eficacitate imediată (alcool iodat) sau remanentă (clorhexidină).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Volumul recoltat este 5–10 ml la adult sau de 3–5 ml la nou-născut şi copilul mic, iar raportul cantitativ mediu:sânge este de 3%. Se recoltează 2 probe de sânge, una pentru anaerobi şi una pentru aerobi.

URINA

Analiza bacteriologică a urinii se numeşte urocultură, dar pentru că trebuie însoţită de examenul citologic, denumirea completă a analizei este de examen *citobacteriologic* (ECBU). Urina se prelevează în cazul suspiciunii unei infecţii a tractului urinar superior sau inferior. Momentul prelevării este dimineaţa, prima urină, jetul mijlociu, după toaleta riguroasă a tractului genito-urinar, în flacon steril, în volum de 5–10 ml. Însămânţarea trebuie să fie cât mai rapidă, conservarea se poate face câteva ore, la +4°C.

LCR

Recoltarea este indicată în cazul sindroamelor meningeale cu sau fără febră, cefalee, redoarea cefei, fotofobie, hiperreflexie. Principalii agenţi infecţioşi implicaţi sunt reprezentaţi de *Str. pneumoniae*, *N. meningitidis* (la adult), *H. influenzae* (la copil) şi *Str. agalactiae*, *E. coli*, *L. monocytogenes* (la nou-născut). Prelevarea se face prin puncţie lombară, la nivelul L_4-L_5, L_5-S_1, sau puncţie suboccipitală la copil şi nou-născut. Asepsia trebuie să fie ireproşabilă, o contaminare chiar minimă putând cauza erori. Pentru asepsie se utilizează alcool iodat sau antiseptice remanente (clorhexidină). Volumul de lichid recoltat (2–8 ml) este divizat în 3 fracţii care vor fi supuse examenului citologic, bacteriologic şi respectiv biochimic şi virologic.

Se recomandă de asemenea examinarea cu tuş de China pentru diagnosticul *Cryptococcus neoformans* şi evidenţierea antigenelor solubile prin teste rapide, imunologice. Însămânţarea se face pe medii îmbogăţite (geloză-chocolat cu factori de creştere). Recoltarea se face obligatoriu în spital, iar probele se menţin la 30–37°C până la însămânţare.

SECREŢIILE BRONHO-PULMONARE

Analiza secreţiilor se recomandă în caz de suspiciune clinică, steto-acustică sau radiologică de infecţii bronho-pulmonare, infecţii comunitare cu pneumococ, legioneloze, tuberculoze, infecţii nosocomiale, screening-ul portajului de *H. influenzae*, *Str. pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *S. aureus*. Metodele de recoltare pot fi: neinvazive (expectoraţia, caz în care trebuie evitată contaminarea orofaringiană), după toaleta buco-dentară şi clătire cu apă distilată sterilă, după tuse spontană sau indusă prin kineziterapie (inhalare de aerosol de NaCl 3%), iar pentru TBC, se recoltează 3 probe, timp de 3 zile consecutiv; invazive, dirijate sub fibroscopie (aspirat bronşic, spălătură bronşică, spălătură bronho-alveolară), puncţie transtraheală, puncţie pulmonară transparietală. Încărcătura microbiană a expectoraţiei este semnificativă dacă depăşeşte valoarea de 10^7 UFC/ml. În cazul utilizării unei metode invazive, analiza este semnificativă dacă încărcătura microbiană este mai mare de 10^3 UFC/ml.

MATERIILE FECALE

Examenul bacteriologic al materiilor fecale se numeşte coprocultură şi este indicat pentru diagnosticul etiologic al diareei acute infecţioase, gastroenteritelor izolate sau colective, portajului intestinal de *Salmonela* sau de bacterii multirezistente. Momentul prelevării: în timpul tulburărilor digestive, dacă există, fără o pregătire specială (nu se indică utilizarea de supozitoare sau clisma). Spre deosebire de examenul coproparazitologic, coprocultura nu se repetă (excepţie în diagnosticul portajului de bacterii multirezistente, controlul eficienţei tratamentului). Când emisia spontană nu este posibilă, se recomandă recoltarea cu ajutorul tamponului rectal. Asepsia nu este necesară, deoarece materiile fecale conţin 10^9–10^{11} bacterii comensale/ml sau /g. Însămânţarea se face imediat, multiplicarea bacteriilor comensale deteminând apariţia fenomenelor de competiţie şi acidifierea mediului; când acest lucru nu este posibil, materiile fecale sunt conservate în tampon fosfat, glicerol sau păstrare la +4°C. În cazul scaunelor dizenterice se recomandă recoltarea materialului mucosangvinolent.

SECREŢII PURULENTE ŞI SEROZITĂŢI

Analiza bacteriologică este indicată pentru a confirma şi documenta o infecţie înainte de instituirea unui tratament sau în cazul ineficienţei unui tratament administrat empiric. Metodele de prelevare sunt: *superficiale* – când situsul infecţiei este direct accesibil şi se realizează cu ajutorul unui tampon care se descarcă imediat pe mediu şi *profunde* –care necesită o puncţie folosind o pipetă sau seringă. Antisepsia trebuie să fie riguroasă în cazul abceselor închise; pentru abcesele cu fistulă sau plagă superficială infectată (arsuri, escare) se foloseşte o soluţie nebactericidă. Transportul se face evitând desicarea şi în condiţii de anaerobioză. Însămânţarea se face imediat, în 30 minute de la recoltare, iar ca mediu de transport se poate utiliza mediul tip Stuart.

PRELEVATELE DIN SFERA ORL

Recoltarea este indicată pentru diagnosticul etiologic al anginelor (cu streptococi β-hemolitici grup A, asocierea fuso-spirochetiană caracteristică anginei Vincent, *C. diphtheriae*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*), otite, portaj de bacterii multirezistente. Recoltarea se face cu tamponul din: gât (exsudat faringian) (tamponarea amigdalelor, palatului, lojelor amigdaliene, fără a atinge limba), nas (exsudat nazal pentru diagnostic de *B. pertussis*), sinusuri (din meatul mijlociu al sinusurilor anterioare sau puncționarea sinusurilor maxilare), urechea medie (puncție, tampon), urechea externă (tampon sub speculum). Recoltarea se face de obicei în laborator, cu două tampoane (unul utilizat pentru realizarea unui frotiu, iar celălalt pentru însămânțarea imediată pe mediu de cultură).

SECREȚII OCULARE

În mod normal mucoasa conjunctivală este sterilă, dar examenul bacteriologic se realizează în mod sistematic preoperator sau pentru diagnosticul etiologic al unei conjunctivite. Este interzisă orice toaletă locală înainte de prelevare, care se efectuează dimineața, din unghiul intern al ochiului, cu ajutorul tamponului cu care se colectează secrețiile acumulate în cursul nopții.

PRELEVATE DIN SFERA GENITALĂ

Se recomandă în cazul unor infecții ale organelor genitale însoțite sau nu de secreții purulente, sau în cazul prezenței unor ulcerații genitale.

La bărbați se recoltează picătura matinală (diagnostic de *N. gonorrhoeae*) sau se realizează un grataj al mucoasei uretrale cu ajutorul unei chiurete sau tampon rigid spiralat care să permită recoltarea celulelor epiteliale pentru diagnostic de *Mycoplasma* sau *Chlamydia*.

La femei, secrețiile vaginale se recoltează cu ajutorul unei pipete sterile înainte de orice toaletă locală, tratament local, după abstinență sexuală de 3 zile, iar în cazul ulcerațiilor genitale acestea se curăță cu ser fiziologic steril, se presează uşor marginile ulcerației pentru a provoca exsudarea şi apoi se realizează recoltarea lichidului cu ajutorul tamponului. Însămânțarea trebuie să fie imediată, iar pentru diagnosticul infecțiilor cu bacterii intracelulare probele pot fi conservate la +4°C, în mediu adecvat de transport.

PRELEVATE TEGUMENTARE

Recoltarea este indicată pentru supravegherea colonizării bacteriene la arşi, biopsia cutanată permițând şi analiza în profunzime a microbiotei sau pentru determinarea portajului de bacterii multirezistente. Prelevarea se face cu ajutorul tamponului de la nivelul pliurilor axilare şi inghinale, perineului, periombilical, periungular, interdigital, palmar.

Având în vedere că numeroase prelevate sunt inutile sau neexplorabile, înainte de realizarea recoltării unui produs patologic în scopul unei analize microbiologice, trebuie să ne asigurăm că analiza este necesară, că ajută la îmbunătățirea tratamentului, trebuie să ştim ce microoganisme căutăm (bacterii, fungi, microorganisme greu cultivabile), ce material şi ce tehnică se aplică şi dacă este necesară şi o analiză cantitativă.

Tabelul 35.

Infecții bacteriene localizate: agenți etiologici, probe patologice şi diagnostic (Brooks şi colab., 2007)

Infecție	Proba patologică	Agentul etiologic	Examen microscopic	Medii de cultură
Celulită	Biopsie de la marginea leziunii eritematoase	Streptococi, de grup A *S. aureus*	Coci Gram pozitivi	Geloză sânge.
Impetigo	Tampon	Streptococi, de grup A *S. aureus, C. diphtheriae*		
Ulcere cutanate	Biopsie Aspirat tisular	Microbiotă mixtă	Microbiotă mixtă	Geloză sange, MacConkey, EMB; medii pentru anaerobi.
Meningită	CSF	*N. meningitidis*	Diplococi Gram negativi, intracelulari	Geloză chocolat, geloză sânge.
		Haemophilus influenzae	Cocobacili Gram negativi, de dimensiuni mici	Geloză chocolat
		Streptococcus pneumoniae	Diplococi Gram pozitivi	Geloză sânge
		Streptococi de grup B	Coci Gram pozitivi în lanțuri	Geloză sânge
		Escherichia coli; alte *Enterobacteriaceae.*	Bacili Gram negativi.	Geloză sânge
		L. monocytogenes	Bacili Gram pozitivi.	Geloză sânge, hemoliză.

BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Abces cerebral	Puroi recoltat şi transportat în condiţii de anaerobioză	Infecţie mixtă; anaerobi şi coci aerobi Gram pozitivi sau coci/bacilli Gram negativi sau coci aerobi Gram pozitivi.	Coci Gram pozitivi sau microbiotă mixtă.	Geloză sânge, geloză chocolat; medii pentru anaerobi.
Abces perioral	Puroi	Microbiotă oro-faringiană, rar actinomicoză.	Microbiotă mixtă	Geloză sange, geloză chocolat; medii pentru anaerobi MacConkey sau EMB.
Faringită	Tampon	Streptococi de grup A	Nu se recomandă	Geloză sânge sau mediu selectiv
		C. diphtheriae	Nu se recomandă	Mediu Loeffler sau Pai', apoi cisteină telurit sau mediu Tinsdale.
Tuse convulsivă (pertusis)	Tampon	*B. pertussis*	Nu se recomandă	Agar Regan-Lowe.
Epiglotită	Tampon	*H. influenzae*	Nu se recomandă	Geloză chocolat sau sânge.
Pneumonie	Spută	*Str. pneumoniae*	Frecvente PMN, coci Gram pozitivi în perechi sau lanţuri, umflarea capsulei.	Geloză chocolat sau sânge, MacConkey sau EMB.
		S aureus – rar	Coci Gram pozitivi în perechi, tetrade, ciorchine.	Geloză chocolat sau sânge, MacConkey sau EMB.
		Enterobacteriaceae şi alţi bacili Gram negativi.	Bacili Gram negativi.	Geloză sânge, MacConkey sau EMB.
		Etiologie mixtă aero-anaerobă.	Microbiotă respiratorie mixtă, rareori PMN.	Geloză sânge, MacConkey, sau EMB; mediu pentru anaerobi.
Emfizem pulmonar	Puroi	Aceeaşi ca în pneumonie sau microbiotă mixtă.	Microbiotă respiratorie mixtă.	Geloză sânge, MacConkey, sau EMB; mediu pentru anaerobi.
Abces hepatic	Puroi	*E. coli; Bacteroides fragilis;* microbiotă mixtă aerobă sau anaerobă, *Entamoeba histolytica*	Bacili Gram negativi; microbiotă mixtă.	Geloză sânge, MacConkey, sau EMB; mediu pentru anaerobi.
Colecistită	Bilă	Bacili enterici aerobi Gram negativi, *B fragilis.*	Bacili Gram negativi.	Geloză sânge, MacConkey, sau EMB; mediu pentru anaerobi.
Abces abdominal sau perirectal	Puroi	Microbiotă intestinală	Microbiotă mixtă, uneori > 5 specii.	Geloză sânge, MacConkey, sau EMB; mediu pentru anaerobi.
Febră enterică, tifoidă	Sânge, fecale, urină,	*Salmonella* typhi	Nu se recomandă.	MacConkey, Hektoen, agar cu sulfit de bismut;
Enterite, enterocolite, diaree bacteriană, gastroenterite.	Fecale	*Salmonella* sp., altele decât *S. typhi.*	PMN	MacConkey, Hektoen, agar cu sulfit de bismut.
		Shigella sp.	Coloraţia Gram sau cu albastru de metilen poate evidenţia PMN.	MacConkey, Hektoen, agar cu sulfit de bismut.
		Campylobacter jejuni	Bacili Gram negativi în formă de "aripi de pasăre", PMN.	Campy BAP incubat la 42°C.
		Vibrio cholerae	Nu se recomandă.	Tiosulfat citrat bilă sucroză (TCBS) (colonii galbene); Apă peptonată cu taurocolat.
		Alţi vibrioni	Nu se recomandă.	Similar ca pentru *V cholerae*
		Yersinia enterocolitica	Nu se recomandă.	MacConkey/CIN (cefsulodin-Irgasan-novobiocină) incubate la 25°C, opţional îmbogăţire la 4°C.
Colită hemoragică sau SHU	Fecale	*E coli* O157:H7	Nu se recomandă.	MacConkey cu sorbitol (colonii sorbitol negative).
Infecţii de tract urinar	Urină	*E coli; Enterobacteriaceae;* alţi bacili Gram negativi.	Bacili Gram negativi pe frotiu din urină necentrifugată 10^5 UFC/mL.	Blood agar; MacConkey sau EMB.
Uretrită/cervicită	Tampon	*Neisseria gonorrhoeae*	Diplococi Gram negativi asociaţi cu PMN.	Thayer-Martin modificat.
		Chl. trachomatis	PMN.	Celule McCoy tratate cu cicloheximidă.
Ulcere genitale	Tampon	*Haemophilus ducreyi* (chancroid)	Microbiotă mixtă.	Geloză chocolat cu IsoVitaleX şi vancomicină.
		Treponema pallidum (sifilis)	Microscop cu fond întenecat sau cu fluorescenţă.	
	Aspirat ganglionar	*Chl. trachomatis*	PMN.	Celule McCoy tratate cu cicloheximidă.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Boala inflamatorie pelvică	Tampon cervical	*N. gonorrhoeae*	PMN associate cu diplococi Gram negativi diplococci; microbiotă mixtă	Thayer-Martin modificat; PCR
		Chl. trachomatis	PCR	Celule McCoy tratate cu cicloheximidă
	Aspirat de col uterin	*N. gonorrhoeae*	Diplococi Gram negativi asociați cu PMN.	Mediu Thayer-Martin modificat
		Chl. trachomatis	PMN	Celule McCoy tratate cu ciloheximidă.
		Microbiotă mixtă	Microbiotă mixtă.	Geloză sânge, MacConkey, sau EMB; mediu pentru anaerobi.
Artrită	Aspirat articular, sânge,	*S. aureus*	Coci Gram pozitivi în perechi, tetrade, grămezi.	Geloză sânge, geloză chocolat.
		N. gonorrhoeae	Diplococi Gram negativi asociați cu PMN.	Mediu Thayer-Martin modificat.
		Alte specii	Tipuri morfologice varibile, în funcție de etiologie.	Geloză sânge, geloză chocolat mediu pentru anaerobi.
Osteomielită	Puroi sau os	Multiplă; frecvent *S. aureus*	Tipuri morfologice varibile, în funcție de etiologie.	Geloză sânge, MacConkey, sau EMB; mediu pentru anaerobi.

15.3. Analiza bacteriologică a probelor din tractul respirator

Infecțiile tractului respirator sunt clasificate în infecții ale etajelor superioare (rinite, faringite sau angine, sinuzite, otite, laringite) şi inferioare (traheite, bronşite, pneumonii, bronho-pneumonii, pleurezii).

Dintre ITRS cele mai frecvente sunt faringitele. În acest caz pentru diagnostic este necesară recoltarea exsudatului faringian (etimologia pledează pentru forma *exsudat*: lb. latină, *exsudatio -onis*, ex = în afară, *sudare* = a transpira. Forma folosită, *exudat*, este un exemplu de neologism deformat, impropriu folosit).

Recoltarea exsudatului faringian se recomandă în cazul anginei acute, recidivante, ulcero-necrotice, candidozei oro-faringiene şi al unor infecții cu transmitere sexuală.

Acest produs nu prezintă interes în cazul flegmoanelor amigdaliene cu colecții închise, epiglotitei, produsă în principal de *H. influenzae* (diagnosticat prin hemocultură), în care recoltarea din gât poate fi periculoasă, sindromului anginos din infarctul pulmonar Lemierre, generat de *Fusobacterium necrophorum* (diagnosticat din hemocultură sau puncție pleurală), ulcerațiilor oro-faringiene (prelevarea din leziune nu este recomandată datorită prezenței treponemelor comensale, dificil de delimitat de *T. pallidum* la microscopul cu fond negru şi cu sensibilitate scăzută pentru detectarea prin metoda IF).

70% din cazurile de faringite acute sunt de natură virală, iar *Str. pyogenes* (streptococul β-hemolitic de grup A) este principalul agent etiologic al anginei bacteriene acute, alături de streptococii de grup B, C şi G. Cultivarea rămâne metoda de referință pentru evidențierea acestei bacterii, cu o sensibilitate de 90–95% față de 80–90% în cazul truselor de identificare rapidă.

Tabelul 36.

Agenții patogeni, izolați din exsudatul farinagian, semnificativi în diferite contexte clinice (adaptat după REMIC 2008, WHO, 2003, Buiuc şi Neguț, 2009).

Contextul clinic	Agenți patogeni
Angina acută	*Str. pyogenes* (grup A) Streptococci β-hemolitici de grup B, C şi G
Angina eritemoatoasă (însoțită de o iritație cutanată)	*Str. pyogenes* şi *Arcanobacterium haemolyticum* (mai ales la adultul tânăr)
Angina recidivantă	Suplimentar *H. influenzae, S. aureus, Moraxella (Branhamella) catarrhalis*
Angina ulcero-necrotică	Asociația fusospirilară caracteristică anginei Vincent
Angina difterică (cu membrane false)	*C. diphtheriae* (Begg, 1994)
Candidoza orofaringiană	*C. albicans*
Bilanțul inițial al unei boli cu transmitere sexuală Faringita gonoreică	*N. gonorrhoeae*
Pneumonie interstițială	*Chl. pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae* (mai ales la copii)
Flegmonul amigdalian Amigdalită cu microabcese	*S. pyogenes, H. influenzae, S. aureus*, anaerobi (*Fusobacterium* spp., *B. fragilis, Peptostreptococcus* spp.).

Patogenii semnificativi (tabelul 36) trebuie diferențiați de speciile ce alcătuiesc microbiota comensală de la nivelul tractului respirator superior, care nu trebuie identificate sau raportate, reprezentate de: streptococi viridans (α-hemolitici), tulpini de *Neisseria* spp. nepatogene, *Moraxella* (anterior *Branhamella*) *catarrhalis* (considerată patogenă doar în anumite cazuri), stafilococi (*S. aureus*, *S. epidermidis*), difteromorfi, *Haemophilus* spp., levuri (*Candida* spp.) în cantitate redusă, diferite tulpini strict anaerobe, spirochete și forme filamentoase, *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Klebsiella* spp., etc.) și bacili Gram negativi nonfermentativi (*Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp.) la pacienții vârstnici, malnutriți și imunodeprimați, la care pot fi de asemenea identificate în cantitate mare *S. aureus*, *Candida* spp. sau alte specii de fungi (REMIC; 2008, Buiuc și Neguț, 2009). În acest ultim caz, chiar dacă aceste specii nu produc faringită, decât pe fondul unei granulocitopenii, totuși trebuie raportate clinicianului, datorită posibilității apariției unei ITRI.

Recoltarea exsudatului nazal este recomandată pentru diagnosticul rinitelor sau sinuzitelor. Rinitele sunt în majoritate virale sau nemicrobiene (alergice, mecanice, medicamentoase etc.). Rinita microbiană constă în inflamația mucoaselor nazale cu edeme și secreții, produsă de bacterii (stafilococi, streptococi, *Enterobacteriacee*, bacilul piocianic) și levuri din genul *Candida*. Examenul direct poate orienta asupra tipului de rinită. Sinuzita este inflamația mucoasei sinusale, cel mai adesea de natură bacteriană (*Str. pneumoniae, Str. pyogenes, H. influenzae,* mai rar *neisserii, Moraxella catarrhalis, S. aureus* și bacili Gram negativi). În sinuzitele cronice apar infecții mixte aero-anaerobe. Recoltarea se realizează de către medicul specialist prin puncționarea sinusurilor.

Recoltarea exsudatului nazal sau faringian poate servi, de asemenea, pentru detectarea purtătorilor de *S. aureus* meticilino-rezistent (MRSA), *N. meningitidis*, *Str. pyogenes* și *C. diphtheriae*.

În cazul investigării portajului de MRSA se efectuează testarea sensibilității doar pentru penicilină (identificarea tulpinilor producătoare de penicilinază) și cefoxitin sau oxacilină (identificarea tulpinilor meticilino-rezistente).

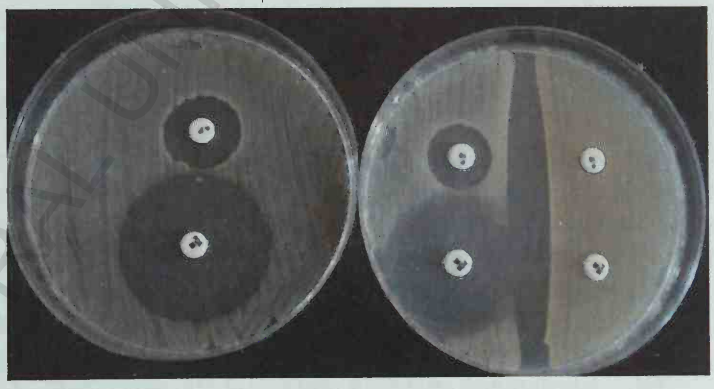


Fig. 323. De la stânga la dreapta: tulpină de *S. aureus* sensibilă la penicilină (P) și meticilină (determinată cu ajutorul discului de cefoxitin – FOX), R la P, MRSA și R la P, MRSA.

Prelevarea și transportul probelor:

- Se realizează înainte de orice tratament local sau general cu antibiotice.
- Prelevarea se realizează cu apăsătorul de limbă, cu ajutorul tamponului, de pe amigdale (sau amigdală în cazul amigdalitei unilaterale), de pe vălul palatin și partea posterioară a faringelui (fig. 324, 325).
  - În cazul existenței unei ulcerații sau a unui exsudat prelevarea se face direct de la nivelul leziunilor;
  - În cazul anginei difterice sunt prelevate și membranele false;
  - Pentru *Candida* recoltarea se face de pe mucoasa linguală, a palatului și a feței interne a obrajilor.
- În cazul în care se recomandă realizarea unui frotiu (leziuni ulcerative) se folosesc două tampoane: unul pentru etalarea pe lamă, iar al doilea pentru însămânțare.
- Dacă însămânțarea nu se realizează în maxim 2 ore, se folosește un mediu de transport tip Stuart sau Amies.
- Recoltarea exsudatului bazal se face cu câte un tampon înmuiat în ser fiziologic pentru fiecare fosă nazală.

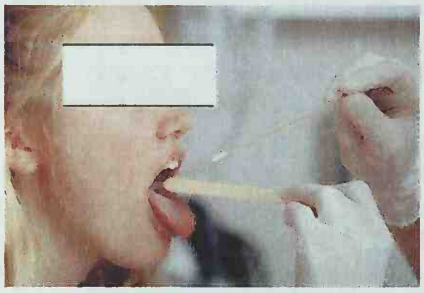
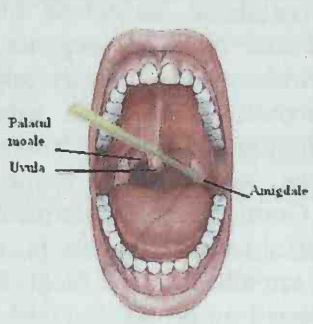


Fig. 324. Recoltarea exsudatului faringian.



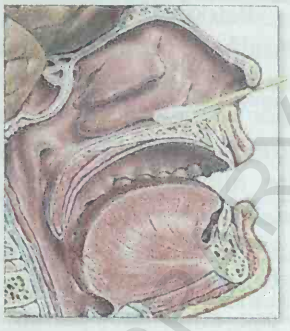


Fig . 325. Recoltarea exsudatului nazal.

Examenul microscopic al frotiului colorat Gram, realizat NUMAI LA CEREREA CLINICIANULUI are drept scop:

- Semnalizarea prezenței sau absenței leucocitelor, indicatori ai inflamației;
- Evidențierea asociației fuso-spirochetale caracteristică anginei Vincent (fig. 326);
- Eventualul sumar al microbiotei (calitativ şi cantitativ);
- Evidențierea levurilor.

Fig. 326. Frotiu realizat din ulcerație faringiană în angina Vincent. Săgețile indică prezența spirochetelor.

Însămânțarea tamponului se realizează pe:

- geloză sânge sau geloză sânge cu inhibitori, incubată în atmosferă de 10% CO_2 sau anaerobioză, pentru o mai bună evidențiere a β-hemolizei produsă de streptococi. Pentru *Arcanobacterium haemolyticum* (bacil Gram pozitiv corineform) incubarea trebuie prelungită cu 24–48 ore;
- geloză cu sânge tratat termic sau geloză chocolat îmbogățită cu factori de creştere pentru *H. influenzae* (*M. catarrhalis* se dezvoltă mai bine pe acest mediu decât pe cele uzuale), incubată în atmosferă de 10% CO_2 cu sau fără bacitracină;
- geloză chocolat îmbogățită cu factori de creştere şi inhibitori (tip VCAT) pentru *N. gonorrhoeae;*
- mediu Loeffler sau Tinsdale modificat pentru *C. diphteriae*;
- mediu Sabouraud cu cloramfenicol sau gentamicină incubat la 30°C pentru *C. albicans.*

Pentru o bună evidențiere a β-hemolizei, mediul de bază nu trebuie să conțină glucoză, sau concentrația trebuie să fie redusă, deoarece acidifierea mediului rezultată în urma fermentării glucozei blochează producerea hemolizinelor (WHO; 2003).

Grosimea stratului de mediu trebuie să fie de 4–5 mm, iar sângele poate proveni de la diferite specii, inclusiv de la donori umani, însă sângele de berbec este de preferat, deoarece poate evidenția activitatea hemolitică a tulpinilor comensale de *Haemophilus sp.,* dar nu şi hemoliza produsă de varianta *zymogenes* a speciei *Enterococcus faecalis* (WHO; 2003). Recunoaşterea coloniilor β-hemolitice poate fi îmbunătățită prin înțeparea mediului în profunzime cu ansa în timpul însămânțării sau prin adăugarea unui disc de cotrimoxazol (biseptol) la care *S. pyogenes* este rezistent şi a unui disc de bacitracină de

concentrație joasă direct pe striul de însămânțare a tamponului. Coloniile de *Str. pyogenes* sunt mici (0.5–2 mm), înconjurate de o zonă clară de β-hemoliză și apar după 18–24 de ore (fig. 327).

Identificarea de certitudine se realizează prin testarea sensibilității la bacitracină de 0.02–0.05 IU (apariția oricărei zone de inhibiție a creșterii în jurul discului). Pentru identificare nu se folosesc discuri de 10U.

Confirmarea serologică se realizează prin aglutinare. Raportarea este semicantitativă (colonii rare, +, + +, sau + + +). La purtători, numărul de colonii este sub 20, în timp ce la pacienții cu faringită sunt foarte frecvente. Coloniile mici care aglutinează cu serul anti-A nu sunt considerate ca aparținînd speciei *Str. pyogenes* și nu sunt asociate cu infecții grave.

Fig. 327. Cultură de *Streptococcus pyogenes* pe geloză sânge.

Fig. 328. Cultură de *H. influenzae* pe geloză chocolat și satelitism pe geloză sânge, în proximitatea culturii de *S. aureus.*

Pentru streptococii β-hemolitici nu se recomandă antibiograma. Tratamentul de elecție în cazul infecției cu *Str. pyogenes,* indiferent de cantitatea în care se regăsește, este benzilpenicilina sau eritromicina. În cazul *H. influenzae* și *M. catarrhalis* se recomandă detecția rapidă a β-lactamazelor.

15.4. Analiza bacteriologică a probelor din tractul respirator inferior

Infecțiile tractului respirator inferior (ITRI) sunt localizate la nivelul traheei, bronhiilor, sau în țesutul pulmonar (traheită, bronșită, abces pulmonar, pneumonie). Uneori, în pneumonie, sunt afectate și membranele adiacente rezultând pleurezia, însoțită uneori de acumulare de lichid în cavitatea pleurală (efuziune pleurală). O formă specială a ITRI este tuberculoza pulmonară. Mulți pacienți cu ITRI prezintă tuse însoțită de secreții purulente, sputa fiind în general verde sau gălbuie. Alteori, secrețiile sunt în cantitate mică sau absente, ca în cazul legionelozei (*Legionella pneumophila*), pneumoniei produse de *Mycoplasma pneumoniae* ("pneumonie atipică primară") și *Chl. pneumoniae.* Aceste etiologii necesită pentru confirmare tehnici speciale (serologie și izolare pe medii speciale).

La pacienții cu bronșită acută (consecutivă, de regulă, unei infecții virale acute), nu se recomandă analiza microbiologică a sputei decât în cazurile în care nu se observă semne clinice de ameliorare.

În cazurile de bronșită cronică de lungă durată, din sputa care este de obicei gri, cu aspect mucoid se izolează patogenii respiratori clasici (*H. influenzae, Str. pneumoniae,* sau mai rar, *Moraxella (Branhamella) catarrhalis).*

În abcesele pulmonare, rezultate după inhalarea corpilor străini, a conținutului gastric sau a secrețiilor tractului respirator superior (pneumonie de aspirație), se poate analiza sputa sau puroiul de abces. În acest caz, pot fi izolate bacterii anaerobe*: Prevotella melaninogenica* (fostă *Bacteroides melaninogenicus)* și *Peptostreptococcus spp.*

Pneumonia acută lobară afectează de obicei un singur lob pulmonar și este aproape totdeauna cauzată de *Str. pneumoniae*, și mai rar, de *Klebsiella pneumoniae.*

Bronhopneumonia (asociată cu apariția zonelor de infiltrație și de inflamație în unul sau în ambii plămâni) este produsă de virusuri sau bacterii. Etiologia bacteriană este reprezentată de *Str. pneumoniae, H. influenzae, S. aureus, E. coli, K. pneumoniae* și *Ps. aeruginosa.* În caz de pleurezie, lichidul pleural trebuie examinat microscopic și cultivat.

Sputa pacienților cu tuberculoză pulmonară nu este de obicei foarte purulentă, dar trebuie etalată pe frotiu pentru colorația Ziehl-Neelsen. Dacă frotiul este pozitiv pentru BAAR, sputa este decontaminată şi cultivată pe mediu Lowenstein-Jensen.

Procedurile bacteriologice pentru diagnosticul infecțiilor piogenice respiratorii (bronşita şi pneumonia), sunt fundamental diferite de cele pentru tuberculoză, motiv pentru care vor fi tratate separat.

Recoltarea sputei

Se realizează după o tuse forțată, într-un recipient steril cu gură largă, după clătirea gurii cu apă distilată, petru a evita contaminarea cu bacterii din microbiota orofaringelui. O probă de "spută" constând din salivă şi resturi alimentare nu trebuie examinată. Recipientul închis etanş se trimite imediat la laborator şi se examinează fără întârziere pentru a evita multiplicarea bacteriilor comensale prezente în probă.

Evaluarea macroscopică

Aspectul macroscopic al sputei trebuie înregistrat, iar posibilele descrieri includ:

- **Aspecte revelatoare pentru infecție pulmonară**: purulent/verde, purulent/galben, mucopurulent / cu urme de sânge / cu flocoane verzi;
- **Spute cu aspecte necorespunzătoare pentru examenul bacteriologic, care nu trebuie examinate în infecțiile non-tuberculoase:** gri, mucoid / gri, lipsit de conținut / alb, mucoid / alb, lipsit de conținut / alb, mucoid, cu resturi alimentare / apos (salivă) / apos, cu resturi alimentare.

Examinarea microscopică

Din sputele corespunzătoare macroscopic se realizează frotiuri colorate Gram, din zonele semnificative (ex. porțiuni purulente).

Dacă pe frotiul colorat Gram se observă celule scuamoase, celule epiteliale, frecvent acoperite cu bacterii aderente, acest aspect este caracteristic pentru secrețiile orofaringiene şi proba nu trebuie cultivată. Pentru cultivare, se respinge orice produs care conține mai puțin de 10 neutrofile polimorfonucleare pentru o celulă epitelială.

În schimb frotiul realizat din spute purulente poate orienta rapid diagnosticul ITRI, evidențiind:

- diplococi Gram pozitivi capsulați (*S. pneumoniae*);
- coccobacili mici Gram negativi (*H. influenzae*);
- diplococi Gram negativi, intracelulari şi extracelulari (*Moraxella catarrhalis*);
- coci Gram pozitivi în ciorchine (*S. aureus*);
- bacili Gram negativi (*Enterobacteriaceae* sau *Pseudomonas* spp.);
- levuri Gram pozitive şi/sau micelii (*Candida* spp.).

Cultivarea sputei

Pentru cultivare se selectează porțiunile semnificative care se însămânțează pe:

- geloză sânge, cu un striu de *S. aureus* pentru a facilita creşterea coloniilor satelite de *H. influenzae* şi cu un disc de optochin plasat în mijlocul striului de însămânțare pentru evidențierea *Str. pneumoniae*;
- geloză chocolat;
- agar MacConkey;
- agar manitol (în cazul suspiciunii de *S. aureus*);
- agar Sabouraud (în cazul suspiciunii de *Candida* sp.).

Geloza sânge şi chocolat se incubează la 36°C în atmosferă de CO_2 (exsicator), iar placa de MacConkey în aerobioză.

Plăcile se examinează inițial la 18 ore, apoi se reincubează pentru alte 24 de ore, dacă se constată creştere microbiană insufucientă.

Pe mediile de cultură pot fi observate:

- colonii plate, transparente, cu centrul concav şi zone de α-hemoliză, precum şi o zonă de inhibiție a creşterii în jurul discului optochin (S. *pneumoniae*);
- colonii fine, transparente, convexe, cu creştere satelită în vecinătatea striului de *S. aureus*, nehemolitice şi colonii mult mai mari pe geloză chocolat (*H. influenzae*, confirmat prin evidențierea dependenței de factorii X şi V);

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- colonii uscate, friabile, alb-gri, intens oxidază pozitive (*M. catarrhalis*);
- colonii mijlocii, cu pigment auriu (*S. aureus*, se recomandă efectuarea testului coagulazei, şi fermentaţiei manitolului);
- creşterea pe MacConkey indică prezenţa unor tulpini de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. sau *Acinetobacter* spp;
- colonii albicioase, rotunde, mate (*C. albicans*).

Raportarea creşterii este semicantitativă:
(+) = câteva colonii;
+ = creştere uşoară;
+ + = creştere moderată;
+ + + = creştere abundentă.

Dacă numărul de colonii este redus, acestea provin din microbiota normală comensală a tractului respirator sau sunt rezultatul colonizării, nefiind relevante pentru managementul pacientului, motiv pentru care trebuie să fie raportate ca microbiotă colonizatoare sau deloc.

15.5. Examenul citobacteriologic al urinii (ECU)

Urina este produsul biologic analizat cu cea mai mare frecvenţă în laboratorul de microbiologie. Cele mai frecvente infecţii ale tractului urinar (ITU) sunt cele ale vezicii urinare (cistite) şi ale uretrei. Din aceste situsuri, infecţia poate evolua ascendent la nivelul ureterelor (ureterită) şi ulterior, la nivelul rinichilor (pielonefrite). Femeile sunt mai predispuse la ITU decât bărbaţii. La ambele sexe infecţia poate fi asimptomatică, acută sau cronică. ITU acută este mai frecventă la femeile de diferite vârste şi tratată în ambulatoriu. ITU cronică este prezentă atît la bărbaţi, cât şi la femei de diferite vârste, fiind asociată de obicei cu o afecţiune primară (pielonefrita, prostatita, anomalii congenitale ale tractului genito-urinar) şi necesită internare (WHO, 2003). Indiferent de tipul ITU, sunt implicate bacteriile enterice, în special *E. coli* alături de *Proteus mirabilis* şi mai rar *P. vulgaris, Serratia marcescens, K. pneumoniae, Enterobacter aerogenes, enterococi, Ps. aeruginosa, stafilococi coagulază-negativi, S. aureus, S. saprophyticus* (la femeile tinere), iar la pacienţii imunodeprimaţi, *Corynebacterium urealyticum* (vechiul grup D2), *Candida* spp. (C. *albicans* şi C. *glabrata*), *Oligella urethralis, Aerococcus urinae* şi *Lactobacillus* spp. (REMIC, 2008).

Prezenţa a două sau mai multe tipuri de microorganisme diferite într-o urocultură semnifică recoltarea / manipularea necorespunzătoare a probei şi necesită repetarea recoltării, cu excepţia pacienţilor cateterizaţi unde pot fi adesea obţinute culturi polimicrobiene din urină.

Pentru realizarea corectă a diagnosticului citobacteriologic al urinii este necesară respectarea următoarelor condiţii:
- recoltarea aseptică a urinii şi transportul corect la laborator;
- cunoaşterea principalelor specii microbiene care produc ITU;
- cunoaşterea etapelor ECU;
- interpretarea rezultatelor;
- efectuarea unei antibiograme corecte.

Recoltarea se realizează diferit, în funcţie de circumstanţele anatomo-clinice: caz general, pacient sondat, sugar, analiza pentru micobacterii, ureterostomie neo-vezicală (Bricker):
- în general, se recoltează prima urină de dimineaţă, după igienizarea mâinilor şi toaleta locală cu săpun sau antiseptic. Se elimină primul jet (20 ml) de urină apoi se recoltează proba într-un flacon steril, fără a se atinge partea superioară a recipientului. Flaconul este închis ermetic, etichetat şi dus imediat la laborator însoţit de fişa şi ora recoltării. Dacă acest lucru nu este posibil, proba se poate menţine câteva ore la +4°C;
- pacient cateterizat: puncţionarea pungii de colectare a urinii dezinfectată în prealabil, cu o seringă sau cu un sistem de aspiraţie cu vid şi transferul urinii recoltate într-un flacon steril;
- sugar: este folosit un colector steril specific, de unică utilizare care poate fi instalat pentru maximum o oră. Dacă în acest interval copilul nu a urinat, dispozitivul este înlocuit cu unul nou. Urina poate fi recoltată şi "din zbor", într-un flacon steril, în cursul micţiunii spontane;

- identificarea micobacteriilor: acest examen trebuie efectuat din toată cantitatea de urină colectată la prima micțiune de dimineață, după restricție hidrică, timp de trei zile.

Circumstanțe particulare:

- urina din primul jet (după un eventual masaj prostatic) este analizată în cazul suspiciunii de infecție uretrală sau prostatică cu *Mycoplasma* sau *Chl. trachomatis*;
- prelevarea urinii direct din vezică prin puncție suprapubiană;
- prelevarea din cateter ureteral permite obținerea probelor separate de urină din cei doi rinichi.

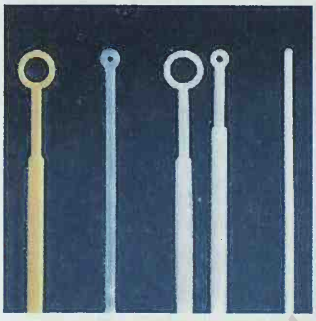
Examenul citologic al urinii este realizat prin **metode cantitative**, pe sedimentul urinar obținut prin centrifugarea probei de urină timp de 5 minute la 1800 rpm, cu ajutorul unei camere de numărare a celulelor (în condiții fiziologice urina conține sub 10.000 leucocite și 5.000 hematii per ml; în cazul infecției urinare procesul inflamator se traduce cel mai adesea prin prezența a peste 50.000 leucocite/ml mai mult de 10.000 hematii/ml și prezența celulelor uroteliale) sau **calitative** (prin examinarea frotiurilor realizate direct dintr-o picătură de urină necentrifugată, omogenizată, depusă pe o lamă de sticlă și lăsată să se usuce).

Examenul calitativ:

- permite observarea eventualelor microorganisme prezente și alegerea mediilor de cultură în funcție de morfologia și afinitatea lor tinctorială;
- prezența uneia sau mai multor bacterii în câmpul microscopic examinat cu imersie înseamnă $>10^5$ CFU/ml de urină;
- prezența uneia sau mai multor leucocite poate indica o infecție urinară;
- prezența mai multor celule squamoase cu sau fără asocieri de microorganisme semnifică contaminare vaginală, iar dacă rezultatul nu este urgent, se recomandă repetarea probei.

Alternativ, prezența leucocitelor în urină poate fi apreciată prin evidențiarea rapidă a activității esterazei leucocitare.

Însămânțarea probei pentru realizarea examenului bacteriologic (urocultura) necesită o metodă care să permită **determinarea numărului de microorganisme** și **evaluarea cantitativă a bacteriuriei** (diluarea urinii, însămânțarea cu ansa calibrată, metoda lamei sau hârtiei de filtru imersate în urină și amprentate apoi pe mediu cu lactoză timp de 2–3 secunde) (329–332).



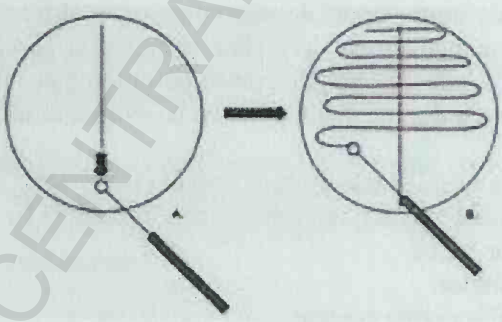
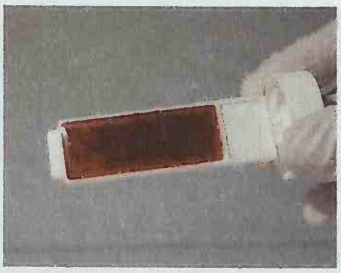


Fig. 329. Însămânțarea probei de urină cu ansa calibrată (se utilizează ansa de 1 µl, cu care se trasează mai întâi un striu longitudinal, apoi striuri transversale perpendiculare pe striul inițial, traseul de însămânțare având aspect de "brad") (WHO, 2003).



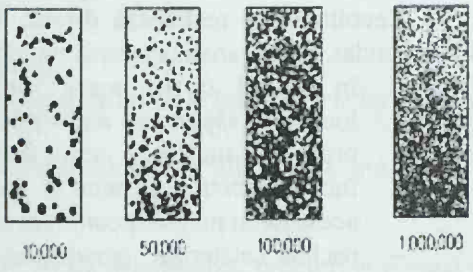


Fig. 330. Intepretarea cantitativă a bacteriuriei prin metoda lamei imersate.

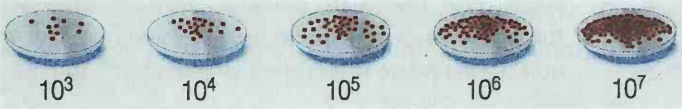


Fig. 331. Interpretarea cantitativă a bacteriuriei pe mediu cromogen (Uriselect 4 – Biorad).

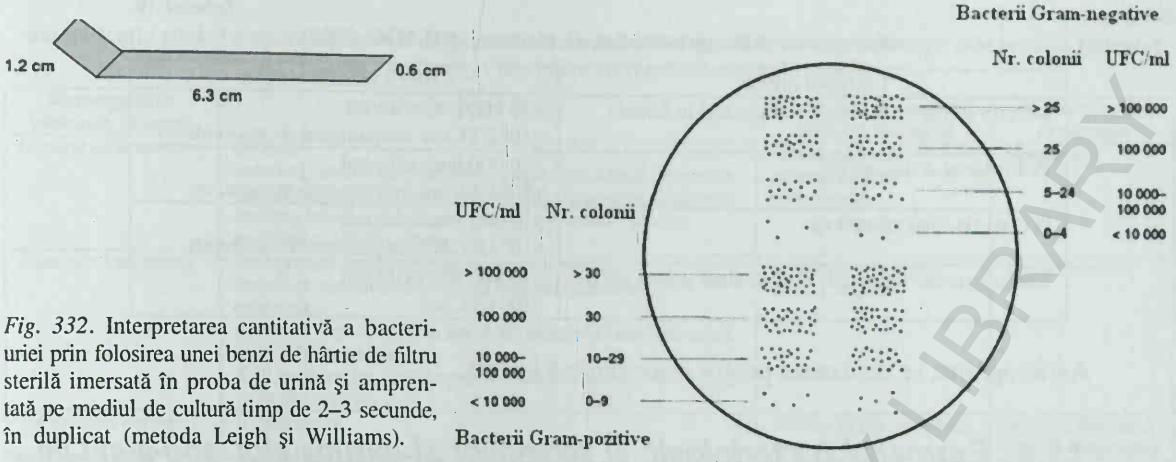


Fig. 332. Interpretarea cantitativă a bacteriuriei prin folosirea unei benzi de hârtie de filtru sterilă imersată în proba de urină şi amprentată pe mediul de cultură timp de 2–3 secunde, în duplicat (metoda Leigh şi Williams).

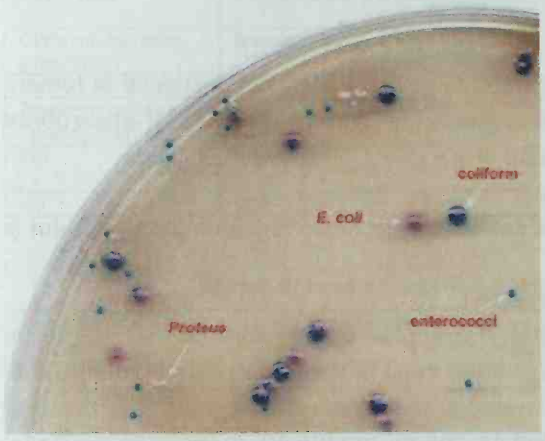


Fig. 333. Diferenţierea coloniilor aparţinând diferitelor specii pe mediu cromogen.

Mediile utilizate sunt mediul lactozat (CLED, MacConkey, brom crezol purpur etc) (pentru izolarea bacililor) şi geloză sânge (pentru izolarea cocilor) sau mediu cromogen, care permite diferenţierea coloniilor aparţinând diferitelor specii pe baza morfologiei şi a culorii acestora (fig. 333).

După incubare timp de 24 ore sau după caz, 48 de ore, se continuă diagnosticul cu identificarea microorganismelor pe baza aspectului coloniilor (dacă s-a utilizat mediu cromogen) sau prin realizarea testelor oxidazei şi catalazei, care vor orienta alegerea galeriilor de identificare (teste individuale – indol, β-glucuronidază -Killian şi Borrow, 1976, TDA, sisteme multitest sau galerii API).

Tabelul 37.

Interpretarea calitativă a creşterii pe medii de cultură (REMIC, 2008).

	Creştere pe geloză sânge	Creştere pe mediu lactozat	Rezultat
Un singur tip de colonii	+	+	BGN, levuri
Un singur tip de colonii	+	–	CGP, corineformi
Un singur tip de colonii	–	–	Bacterii fastidioase, intracelulare, urocultură sterilă
Două sau mai multe tipuri de colonii	+	+	Contaminare: Nu se lucrează !!! Excepţie: pacienţi cateterizaţi.

În funcţie de criteriul bacteriologic (nivelul bacteriuriei), interpretarea clinică a uroculturii este:

- bacteriurie $<10^3$ UFC/ml – absenţa infecţiei;
- bacteriurie $>10^5$ UFC/ml – posibilă infecţie;
- între 10^3 şi 10^4 UFC/ml – incertitudine (se repetă).

Interpretarea rezultatelor ECU combină parametrii clinici, citologici şi bacteriologici (tabelele 37, 38, 39).

Tabelul 38.

Interpretarea rezultatelor ECU (REMIC, 2008).

Diagnostic microbiologic	Bacteriurie	Piurie	Simptome	Tratament
Colonizare	+	–	–	–
Infecţie asimptomatică	+	+	–	+*
Infecţie simptomatică	+	+	+	+
Inflamaţie fără infecţie	–	+	–	±
Simptome fără infecţie	–	–	+	±
*În unele circumstanţe particulare				

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Tabelul 39.

Interpretarea bacterio-clinică a uroculturii (REMIC, 2008).

Categorii clinice	Criterii microbiologice
Infecție urinară acută fără complicații la femeie	≥10 000 leucocite/ml $\geq 10^3$ UFC/ml uropatogeni recunoscuți
Pielonefrita acuta simplă	≥10 000 leucocite /ml $\geq 10^4$ UFC/ml uropatogeni recunoscuți
ITU cu risc sau complicate	≥10 000 leucocite /ml $\geq 10^5$ UFC/ml uropatogeni recunoscuți
Bacteriurie asimptomatică (controlată prin 2 ECU)	≥10 000 leucocite /ml $\geq 10^5$ UFC/ml

Antibiograma se realizează pentru orice tulpină izolată.

15.6. Examenul bacteriologic al secreţiilor şi exsudatelor ano-genitale se realizează în următoarele scopuri:

- izolarea microorganismelor patogene din microbiota genitală normală, în special la femei;
- diagnosticul infecțiilor de tract genital şi al vaginozelor (datorate proliferării anaerobilor sau a bacteriilor de tip *Mobiluncus sp.*) (tabelul 40);
- diagnosticul infecțiilor cu transmitere sexuală;
- stabilirea unei antibioterapii țintite, alegerea antibioticelor, supravegherea tratamentului şi a vindecării;
- prevenirea infecțiilor cu transmitere sexuală (BTS).

În funcție de prezența/absența microbiotei, uterul şi trompele uterine sunt normal sterile, în timp ce vulva, vaginul şi exocolul uterin se colonizează imediat după naştere. Microbiota vulvară este bogată şi variată, fiind reprezentată în special de microbiota tegumentară a regiunii perineale şi depinde de igiena locală individuală. Microbiota vaginală suferă modificări în raport cu vârsta, depinzând de secreția de hormoni ovarieni şi de activitatea sexuală. Astfel, în perioada de activitate sexuală, secreția de estrogeni determină depozitarea glicogenului în celulele epiteliale ale mucoasei vaginale. Dintre speciile normal prezente în microbiota genitală, doar bacilii Döderlein fermentează lactic glicogenul şi determină un pH acid al vaginului (3,8–4,2) (fig. 335). În condițiile de pH acid, numeroasele specii din vagin se află într-un echilibru optim, deşi unele sunt virulente: specii de *Clostridium, Bacteroides, enterococi, stafilococi, Gardnerella,* levuri, *E. coli,* dar acestea nu proliferează (stare de echilibru sau eubioză).

Dacă valoarea pH se modifică, se instalează *disbioza* şi apar vaginozele. Ecosistemul vaginal poate fi perturbat fie de microbiota endogenă, fie de un microorganism exogen. În cazul disbiozei, lactobacilii sunt în minoritate (frotiu colorat Gram sau Giemsa). Examenul microscopic poate face diferența între vaginoze şi vaginite, între o colonizare şi o infecție cu *Candida* sau o infecție cu *Trichomonas*. La pubertate şi după menopauză, lactobacilii sunt înlocuiți cu alte specii (fig. 334a, 335b).

Dintre organele tractului genital masculin, prostata, canalele ejaculatoare, veziculele seminale, epididimul, testiculele sunt fiziologic sterile. Uretra, datorită poziției sale, reprezintă principala cale de acces a infecției nu numai către tractul urinar proximal, ci şi către tractul genital. Propagarea infecției se face predominant către organele genitale şi mai puțin către cele urinare, principalele microorganisme implicate fiind cele transmise pe cale sexuală.

Secreția uretrală poate fi discretă sau abundentă. În mod normal secreția uretrală conține un număr mic de celule descuamate şi bacterii Gram pozitive (coci şi difteroizi). Sub raport etiologic, uretritele pot fi gonococice şi ne-gonococice. Prezența unei secreții purulente, cu numeroase PMN, dar fără microorganisme pe frotiu şi culturi negative, sugerează o etiologie cu *Mycoplasma, Chlamydia*, virus herpetic, *Trichomonas* sau chiar nemicrobiană: medicamentoasă, alergică, traumatisme mecanice etc.

Tabelul 40.

Semnificația clinică a microorganismelor prezente la nivelul căilor genitale sau transmise pe cale sexuală (adaptat după van Dyck et al., 1999; WHO, 2003; REMIC, 2008).

Microorganisme totdeauna patogene	Sindromul clinic	Microorganisme comensale condiționat patogene	Microorganisme nepatogene
Neisseria gonorrhoeae	Gonoree Bartolinită, cervicită, corio-amnionită, conjunctivită, infecții gonococice generalizate (artrită, dermatită, tenosinovită), endometrite, epididimită, sterilitate, faringită, vaginită prepubertală, perihepatite, proctite, prostatite, salpingite, uretrite.	*Candida albicans* – balanoprostatite, vulvovaginite	*Lactobacillus*
Chlamydia trachomatis	Limfogranulomatoza venerică (serotipurile L1-L3) Bartolinită, cervicita, conjunctivita la sugari, endometrite, epididimită, (serovar D-K) pneumonie la sugari, sterilitate, otită medie la sugari, boala inflamatorie pelvică (PID), perihepatite, vaginite prepubertale, proctite, sindrom Reiter, salpingita, uretrite.	*Gardnerella vaginalis* – uretrite, vaginite	*Corynebacterium*
Trichomonas vaginalis	Trichomonoza	*Mobiluncus spp.* – vaginoze	*Neisseria.* Alte specii decât *N. gonorrhoeae*
Herpes virus	Herpesul genital și orolabial, meningite, herpes neonatal, proctite	*Mycoplasma, Ureaplasma* – uretrite	*Staphylococcus* non *aureus*
Calymmatobacterium granulomatis	Granuloma inguinale (donovanoză)	*Staphylococcus aureus*	
Haemophilus ducreyi	Șancrul moale	*Streptococcus spp.*	
Treponema pallidum	Sifilis	Bacterii strict anaerobe	
Cytomegalovirus (CMV)	Infecții congenitale	Enterobacterii	
HBV	Hepatita B	Papillomavirus – veruci virale, neoplazie cervicală.	
HIV	SIDA		

Tabelul 41.

Metode de recoltare a probelor din tractul genital (adaptat după REMIC, 2008).

Recoltarea produselor de tract genital la ambele sexe	Recoltarea produselor de tract genital feminin	Recoltarea produselor de tract genital masculin
Uretrite: ➢ Prelevat endo-uretral cu tamponul. ➢ Pentru *Chlamydia,* raclaj endo-uretral sau recoltarea **primului jet de urină.** **Ulcerații ano-genitale:** ➢ recoltarea serozităților de la nivelul bazei sau marginii ulcerației cu vaccinostil, chiuretă sau tampon. ➢ biopsie sau puncția ganglionului satelit. ❖ **Pustule:** ➢ colectarea conținutului cu seringa sau tamponul. ❖ Prelevat anal sau faringian: diagnosticul BTS.	**Vulvo-vaginite** – recoltarea cu tamponul a secrețiilor din orificiul vaginal și vestibulul vaginal posterior. **Bartolinite** – aspirarea cu seringa din canal sau prelevarea cu tamponul. **Cervicite** – recoltare cu tamponul din endocol. **Endometrite** – prelevat din endocol și eventual aspirarea transcervicală prin cateter. **Anexite** – lichidul de abces este prelevat cu seringa și celulele tubo-peritoneale prin raclaj în cursul intervenției chirurgicale.	**Epididimite, prostatite** – tampon uretral, prelevarea spermei sau recoltarea primului jet de urină. **Prostatite** – recoltarea secrețiilor prostatice dupa eventualul masaj al prostatei și/sau primul jet de urină. **Orhite** – puncționarea abcesului cu seringa (de către chirurg). Agentul infecțios poate fi regăsit și în spermă.
În toate cazurile se recoltează două sau trei probe (examinare directă și însămânțare). Dacă prelevările nu sunt efectuate în laborator, probele trebuie transportate rapid pe medii de transport adecvate (pentru gonococ, *Chlamydia, Mycoplasma,* virus). Secreția atașată pe suprafața valvelor de recoltare, poate servi la efectuarea a 2 teste preliminarii: determinarea valorii pH (pH > 5 este întâlnit în infecția cu *Trichomonas* și în vaginoze) și testul aminelor volatile (prin adăugarea a câtorva picături de soluție de KOH 10% peste proba de secreție vaginală recoltată pe valvă. Degajarea unui miros dezagreabil de pește alterat conduce la suspiciunea de vaginoză). Pentru diagnosticul vaginitei cu *Trichomonas,* se execută rapid examinarea preparatului proaspăt lamă-lamelă, pe care protozoarul are forma și mobilitatea caracteristice. Protozoarele își pierd mobilitatea pe tamponul de vată (fig. 334a). Al doilea tampon este folosit pentru executarea unui frotiu Gram, care permite aprecieri cantitative sau calitative ale microbiotei vaginale. Al treilea tampon, în cazul unei secreții purulente, este utilizat pentru însămânțare pe medii de cultură adecvate.		

Datele clinice și epidemiologice, aspectul leziunilor și localizarea lor, observate în cursul prelevării (tabelul 41) sunt indispensabile pentru orientarea diagnosticului bacteriologic. Ele condiționează valoarea rezultatului care se obține după examinarea citobacteriologică directă (tabelul 42) urmată, după caz, de cultivare (tabelul 43), tehnici de biologie moleculară și examen serologic.

Tabelul 42.

Examenul microscopic al secrețiilor tractului genital

Ulcerații	Microscop cu fond întunecat (ob. 10x) imunofluorescență directă (IF), impregnare argentică sau coloratia Vago.	*T. pallidum* NB: pacienții pozitivi la examinarea directă pot fi serologic negativi, pozitivarea serologică putând apărea în câteva săptămâni.
	Coloratia May-Grundwald-Giemsa	*Haemophilus ducreyi* (fig. 337)
	IF	Ulcerații externe de tip herpetic asociat cu *Chlamydia* (boala Nicolas-Favre) sau cu *Mycoplasma.*
Granulom inghinal	Coloratia May-Grundwald-Giemsa pe frotiuri fixate cu acetonă.	Corpii lui Donovan (reprezentați de *Calymmatobacterium granulomatis* sau *donovani,* bacili capsulați, internalizați în histiocite (van Dyck et al., 1999) (fig. 338).

BCU IAȘI / CENTRUL VECHI LIBRARY

Uretrite, cervicite şi vaginite / secreţie vaginală.	Coloraţia Gram	*N. gonorrhoeae* *C. albicans* Studiul microbiotei vaginale: scor de la I la IV (scor I – microbiotă echilibrată, scor II, III – dezechilibrul microbiotei cu lactobacili prezenţi, scor IV – microbiotă complet substituită în favoarea anaerobilor sau *Gardnerella vaginalis*, lactobacili absenţi).
	Preparat proaspăt în KOH 10% şi vizualizare cu contrast de fază.	*C. albicans* *T. vaginalis*
	Coloraţia May-Grundwald-Giemsa sau Papanicolaou.	"Clue-cells" din vaginoză *T. vaginalis* (fig. 336) Incluzii intracelulare – infecţii cu *Chl. trachomatis.*
	IF	*Chl. trachomatis*
Spermă	Preparat proaspăt Frotiu colorat Gram	Levuri (fig. 334b) *T. vaginalis* Rar ouă de *Schistosoma* *N. gonorrhoeae* Levuri (*C. albicans)* Coci Gram pozitivi Bacili Gram negativi Prezenţa sau absenţa leucocitelor.
Alte produse	Preparat proaspăt sau frotiu examinat Gram sau cu IF	*N. gonorrhoeae* *C. albicans* *Chl. trachomatis*

Tabelul 43.

Cultivarea probelor recoltate din tractul genital

Mediu de cultură	Agenţi patogeni izolaţi
Geloză sânge	*Str. agalactiae* *S. aureus* *Gardnerella vaginalis* (considerată patogenă atunci când este dominantă numeric sau când este asociată cu bacterii anaerobe *Mobiluncus spp).*(fig. 335, 337).
Geloză sânge incubată în anaerobioză.	*Prevotella* (endometritele postpartum sau infecţii asociate dispozitivelor intrauterine).
Mediu lactozat	Bacterii Gram negative (în special enterobacterii).
Geloză chocolat	*N. gonorrhoeae* Rar, *Haemophilus ducreyi* (fig. 337)
Culturi celulare	*Chl. trachomatis*
Medii artificiale îmbogăţite cu ser bovin şi extract de levuri.	*Mycoplasma hominis* *Ureaplasma urealyticum*
Medii speciale pentru micobacterii.	*M. tuberculosis* (endometrite, epididimite).

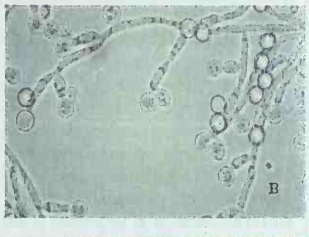


Fig. 334 A,B. Aspectul *Trichomonas vaginalis* şi *Candida albicans* pe preparat proaspăt.

Fig. 335. Diferite aspecte ale frotiului din secreţie vaginală colorat Gram. De la stânga la dreapta: microbiota normală; microbiotă substituită; coci Gram pozitivi; levuro-filamentoasă; *Leptotrichia*; *Mobiluncus* sp.; vaginoză cu *Gardnerella.*

Fig. 336. Trichomonas vaginalis, pe frotiul colorat cu albastru de metil

Fig. 337. Haemophilus ducreyi, pe frotiul colorat Gram (G. Hammond, Public Health Image Library, CDC, 1978).

Fig. 338. Bacili capsulaţi, intracelulari – *Calymmatobacterium granulomatis* (frotiu colorat Giemsa) (O'Farrell, 2002).

LUCIAN BLAGA CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Antibiograma se realizează sistematic pentru microorganismele izolate din infecțiile tractului genital superior, pentru cele *patogene*, pentru tulpinile de gonococ cu determinarea producătorilor de β-lactamaze și nu se practică pentru bacteriile care colonizează în mod normal tractul genital inferior în special la femeie, excepție făcând *Str. agalactiae* (β-hemolitic de grup B) izolat în cursul celui de-al treilea semestru de sarcină, tratat pentru a preveni posibilitatea unei infecții neonatale.

15.7. Diagnosticul bacteriologic al materiilor fecale. Coprocultura

Infecțiile enterice bacteriene (diareea, dizenteria și febrele enterice) sunt factori de risc importanți pentru sănătatea publică în întreaga lume. Diareea infecțioasă constituie a doua cauză de deces la nivel mondial după bolile cardiovasculare, mai ales în populația infantilă. În țările în curs de dezvoltare, boala diareică provoacă 1,5 milioane de decese anual la copiii de 1–4 ani (riscul de îmbolnăvire la această categorie de vârstă fiind de 600 ori mai mare în țările în curs de dezvoltare decât în țările dezvoltate). În țările în curs de dezvoltare, copiii suferă de zece sau mai multe episoade de diaree pe an, fiind frecvent infectați concomitent cu mai mulți agenți enteropatogeni, uneori chiar și în absența simptomatologiei. Odată cu creșterea prevalenței HIV/SIDA și a chimioterapiei imunosupresoare, a crescut numărul de cazuri de boală diareică la pacienții imunocompromiși. Infecțiile enterice bacteriene identificate la pacienții cu HIV/SIDA sunt produse de *Campylobacter, Salmonella* (salmoneloza este de 20 de ori mai frecventă la acești pacienți), *Shigella* și micobacterii (WHO, 2003).

Coprocultura se recomandă în cazul în care scaunul este lichid sau moale, mucilaginos sau hemoragic sau la indicații foarte precise, pentru cele solide.

Diareea poate fi acută sau cronică, însoțită sau nu de o stare febrilă. Nu toate episoadele diareice sunt de natură infecțioasă sau cu etiologie bacteriană, paraziții, virusurile și levurile putând fi de asemenea isolate (tabelele 44, 45).

Tabelul 44.

Etiologia infecțioasă a bolii diareice (WHO, 2003; REMIC, 2008).

	Principalele microorganisme care determină diaree
Bacterii	*Salmonella, Sh. dysenteriae, Sh. flexneri, Sh.boydii, Sh. sonnei, Campylobacter jejuni, C. coli, Yersinia enterocolitica, EPEC, ETEC, EHEC, EIEC, DAEC, EaggEC, V. cholerae, V. fluvialis, V. hollisae, V. mimicus, Aeromonas hydrophila, A. sobria, A. caviae, S. aureus, B. cereus, Cl. difficile, Cl. perfringens, Cl. botulinum.*
Virusuri	*Rotavirus, Adenovirus, Astrovirus, Calicivirus, Coronavirus,* virusul Norwalk.
Protozoare	*Entamoeba, Giardia, Isospora, Cryptosporidium, Balantidium.*
Helminți	*Schistosoma, Strongyloides, Ancylostoma, Necator, Trichuris, Trichinella.*
Levuri	

Obiectivul principal al coproculturii constă în determinarea microorganismelor patogene care produc diaree, prin izolarea acestora dintr-o microbiotă complexă, de o mare densitate și diversitate, care conține 10^9–10^{11} bacterii/ gram de conținut intestinal și este reprezentată de peste 400 specii diferite, dintre care marea majoritate sunt strict anaerobe. Enterobacteriile reprezintă 5-10% cu predominanța *E. coli*. Enterococii, streptococii, stafilococii, lactobacilii și levurile sunt prezente într-un număr mai mic.

Prelevarea și transportul probelor

Scaunele sunt prelevate într-un recipient corespunzător (coprorecoltor), curat, de unică utilizare, fiind interzisă utilizarea recipientelor artizanale de tipul cutiilor de chibrituri; se va recolta cel puțin un volum de 3–5 cm^3, egal cu o nucă, cu ajutorul unei spatule sau a unui recipient cu lopățică și apoi este transferat într-un recipient ermetic închis. Când acestea există, se recoltează porțiunile muco-purulente sau sanguinolente.

Recoltarea cu ajutorul unui tampon rectal sau cu sonda Nelaton este utilizată mai ales în cazul sugarilor și al copiilor mici, în shigelozele cronice sau la investigarea purtătorilor de *Shigella* și *Salmonella* (cu excepția celor de *S. typhi*). După prelevare, produsul patologic se introduce în tuburi sterile cu mediu de conservare.

Biopsiile mucoasei rectale sau colice realizate prin endoscopie sunt analizate ca și materiile fecale, cu excepția examenului specific pentru micobacterii.

Tabelul 45.

Contexte care necesită realizarea unei coproculturi (WHO, 2003; REMIC, 2008).

Context	Indicații pentru coprocultură	Agenți patogeni identificați	Cultivare
Adult sau copil peste doi ani și context bine definit.	Coprocultură standard	*Salmonella* spp. Identificarea până la nivel de serovar se justifică doar în scop epidemiologic *Shigella* spp. *Campylobacter* spp. *Yersinia enterocolitica* *EIEC.*	Mediu de îmbogățire pentru *Salmonella* și *Shigella* (Mueller-Kauffmann, Selenit). Mediu selectiv de izolare (geloză SS, XLD, DCL, Hektoen). Se recomandă repicarea de pe mediu de îmbogățire pe mediu selectiv după 3–6 ore de incubare la 37°C. Identificare biochimică. Confirmare serologică. Medii specifice pentru *Campylobacter* spp. (Karmali, Skirrow sau Buztler). Culturile sunt incubate minim 48 ore la 42°C, în microaerobioză, cu 10% CO_2. *Yersinia enterolitica* – însămânțare pe mediu de îmbogățire (mediu Rapapport), incubare 24–48 ore la +4°C și repicare pe medii specifice pentru *Yersinia* – mediu Wauters (geloză SS îmbogățită cu dezoxicolat) sau mediu Irgasan-cefsulodin și novobiocin incubate timp de 48 ore la 30°C.
Copil sub 2 ani	Coproculturi standard cu accent pe *E. coli* enteropatogen. La această categorie de vârstă predomină etiologia virală.	+ *E. coli* enteropatogen (EPEC), *Rotavirus,* Adenovirus.	+ EPEC pe mediu EMB sau Drigalski.
Nou născuți	Meconiu	*L. monocytogenes* *E. coli* K1 *Str. agalactiae* (grup B).	
Contexte epidemiologice și clinice particulare	Pacienți HIV /SIDA	Bacterii enteropatogene. Virusuri (CMV, HSV, HIV). Protozoare (*Entamoeba histolytica, Isospora belli, Giardia intestinalis,* cryptosporidii, microsporidii).	
	Determinarea stării de purtător la personalul cu risc	Persoanele din anturajul unui pacient, *Ps. aeruginosa* la nou-născuți.	
	Detectarea colonizării de bacterii multirezistente	Enterococ rezistent la vancomicină sau enterobacterii producătoare de β-lactamaze cu spectru larg.	Izolare VRE pe geloză bilă esculină cu 6 mg/l vancomicină ESBL – pe mediu Drigalski cu 0,5-1 mg/l cefotaxim
	Sindrom hemolitic uremic	*E. coli* 0157 și alte tulpini de *E. coli* producătoare de verotoxine.	Izolarea de *E. coli* pe geloză MacConkey cu sorbitol, coloniile sorbitol (-) sunt confirmate prin latex aglutinare.
	Sindrom holeriform	*V. cholerae, ETEC*	*V. cholerae* – îmbogățire în apa peptonată alcalină repicată la fiecare 3 ore pe mediu gelozat specific (de ex. TCBS). Identificare biochimică. Confirmare serologică.
	Bolnavi aflați sub tratament cu antibiotic Colită pseudomembranoasă	*Cl. difficile, C. albicans* *S. aureus, K. oxytoca, Ps. aeruginosa, C. albicans, Cl. perfringens* producător de enterotoxine.	Evidențierea toxinei B în filtratul de materii fecale Determinarea ECP pe culturi celulare (fibroblaste, celule Vero, MRC-5, Mac Coy). Determinarea toxinei A prin tehnica ELISA.
	Toxiinfecție alimentară colectivă cu perioadă scurtă de incubare (1–4h).	*S. aureus* *B. cereus*	Evidențierea toxinelor în filtratul de materii fecale, lichid de vărsătură, aspirate gastrice, serul bolnavului (toxina botulinică).
	Toxiinfecție alimentară colectivă cu perioadă de incubare scurtă (12–72 ore)	*Salmonella spp. Yersinia enterococlitica, Cl. botulinum, Cl. perfringens.*	
	Diaree sero-sangvinolentă toxică cu lipsa elementelor polinucleare la examinarea directă consecutiv ingestiei de apă și alimente. Voiaj într-o țară tropicală	*Aeromonas hydrophila, Plesiomonas shigelloides.*	*Aeromonas* spp. – geloză sânge cu adaos de ampicilină.
	Intoxicație alimentară	Suspiciune de botulism	Tipizarea toxinei din serul bolnavului și din alimentele suspectate.

Proba trebuie să fie imediat transportată la laborator sau conservată maxim o noapte la +4°C pentru a se evita desicarea și proliferarea bacteriilor și levurilor comensale. Pentru aceasta se folosește un mediu de transport adecvat (Stuart, Amies, Cary Blair, apă peptonată, soluție TRIS tamponată etc.).

Pentru izolarea virusurilor, se folosesc recipiente sterile, cu 5–10 cm^3 materii fecale. Proba se refrigerează până în momentul examinării.

Identificarea agenților patogeni izolați presupune atât evidențierea unor caractere biochimice, cât și confirmarea serologică, în cazul unor specii (fig. 339–343).

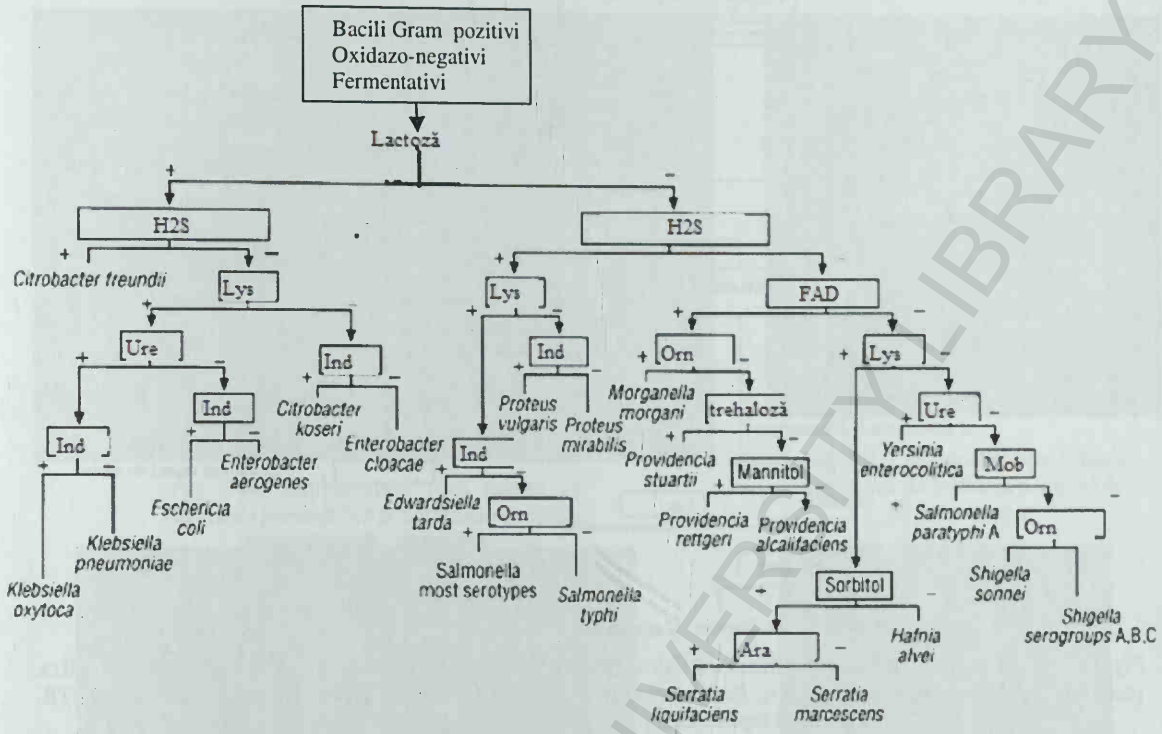


Fig. 339. Cheie dichotomică de identificare a enterobacteriilor pe baza unor caractere biochimice (fermentarea lactozei, producerea H_2S, prezența lizin-decarboxilazelor - Lys, fenilalanin/dezaminazelor – FAD, ureazei – URE; producerea de indol – Ind, producerea ornitin-decarboxilazelor – Orn, fermentarea unor zaharuri) (WHO, 2003).

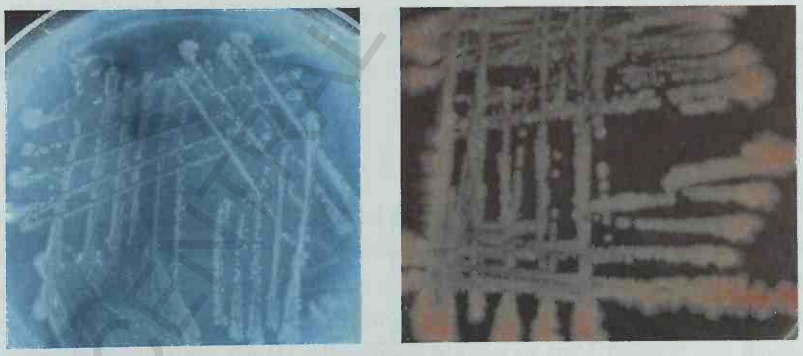


Fig. 340. Shigella sonnei pe medii lactozate (CLED, MacConkey) (colonii lactoză-negative).

Fig. 341. S. tiphymurium pe mediu lactozat (CLED) (colonii lactoză-negative) și *K. pneumoniae* pe medii lactozate (CLED, MacConkey) (colonii lactoză-pozitive, mucoide).

BUCUREȘTI (CENTRALA UNIVERSITY LIBRARY

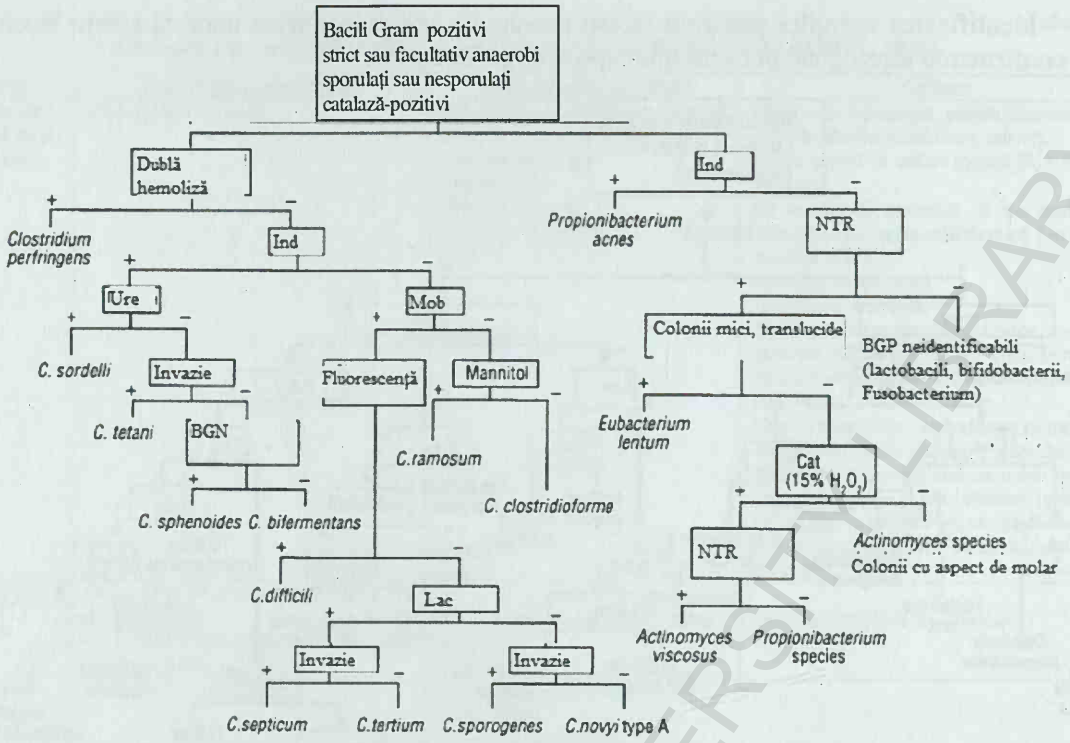


Fig. 342. Cheie dichotomică de identificare a BGP, catalază-negativi, pe baza unor caractere biochimice (hemoliza, producerea indolului – Ind, ureazei – Ure, fermentarea unor zaharuri – Lac, manitol, prezenţa nitrat-reductazei – NTR, invazia pe mediu solid repartizat în plăci, producerea catalazei – Cat) (WHO, 2003).

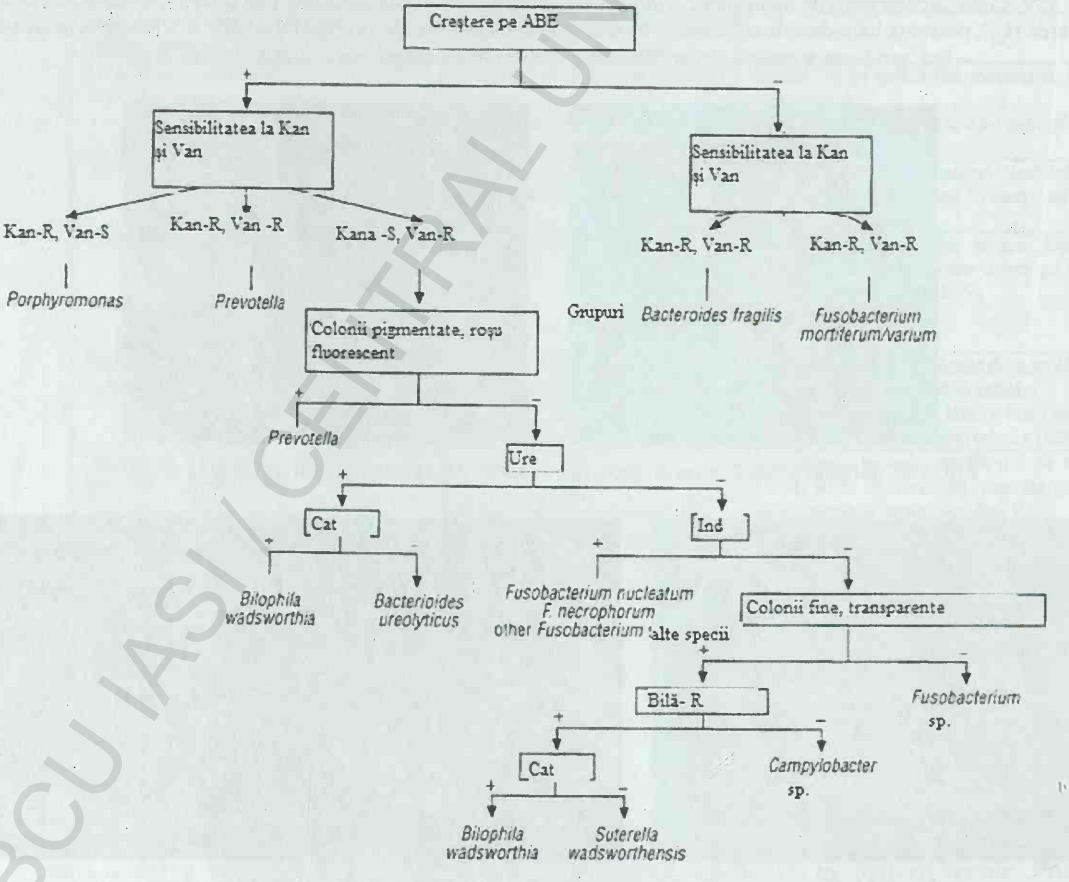


Fig. 343. Cheie dichotomică de identificare a BGN anaerobi, catalază-negativi, pe baza unor caractere de cultură şi biochimice (WHO, 2003).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Antibiograma este recomandată pentru toți agenții patogeni izolați și imperativ necesară pentru *Salmonella, Shigella, E. coli, V. cholerae* (fig. 344–347).

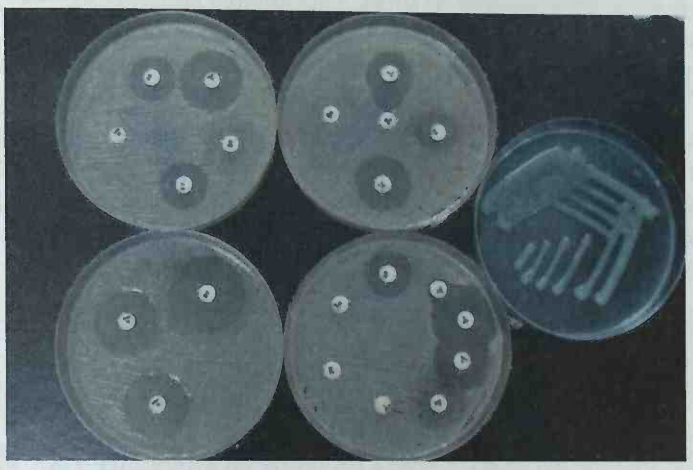


Fig. 344. Antibiograma unei tulpini de *Klebsiella pneumoniae* producătoare de ESBL.

Fig. 345. Confirmarea prin E-test a producerii de ESBL la o tulpină de *K. pneumoniae.*

Fig. 346. Testul Hodge modificat, pentru eviden-țierea producerii de carbapenemaze la o tulpină de *K. pneumoniae* (aspectul de treflă al zonei de inhibiție indică producerea de carbapenemaze).

Fig. 347. Tulpină de *E. faecium* izolată din coprocultură, rezistentă la vancomicină, confirmată prin E-test.

15.8. Hemocultura

Sângele este cultivat pentru detectarea și identificarea bacteriilor sau a altor microorganisme cultivabile (levuri, fungi filamentoși) prin metode clasice sau automate de detectare a creșterii microbiene. Prezența unor astfel de organisme în sânge se numește bacteriemie sau fungemie și este de obicei patologică, deoarece sângele este în mod normal steril, cu câteva excepții: bacteriemia tranzitorie care apare la scurt timp după: extracții dentare sau tratamentele stomatologice, intervenții chirurgicale la nivelul mucoaselor contaminate, contaminare intravenoasă pe cale iatrogenă, bronhoscopie, sau cateterizare uretrală. Bacteriemia tranzitorie poate apărea în infecțiile localizate, precum artrita, escarele, colecistită, enterocolită, meningită, osteomielită, peritonită, pneumonie, pielonefrită, infecții traumatice sau ale plăgilor chirurgicale. Acest tip de bacteriemie tranzitorie se remite de obicei spontan, după fagocitarea bacteriilor comensale. Septicemia este un termen clinic utilizat pentru a descrie bacteriemia însoțită de manifestări clinice care apare în infecțiile severe, cu frisoane, febră, stare de rău general, toxicitate, hipotensiune arterială, forma extremă fiind șocul toxic produs de toxinele bacteriilor Gram negative (LPS) sau ale cocilor Gram pozitivi (acizi teichoici, superantigene) (Mihăescu, 2000; Mihăescu și colab., 2005; 2007). Bacteriemia persistentă apare în bruceloză, leptospiroză, febră tifoidă, endocardite, anevrisme infectate și tromboflebită.

O stare septicemică se caracterizează prin trecerea repetată a microorganismelor în sânge. Febra de origine necunoscută, mai ales dacă este acompaniată de semne clinice evocatoare ale unei infecții, necesită efectuarea unei hemoculturi (tabelul 46).

Tabelul 46.

Criterii predictive ale bacteriemiei (Bates, 1990).

Factor de predicţie pentru hemoculturi pozitive	Punctaj
Temperatura >38,3°C	3
Maladie rapid fatală	4
Maladie terminală	2
Prezenţa frisonului	3
Toxicomanie pe cale venoasă	4
Abdomen chirurgical acut	3
Factor de co-morbiditate majoră[a] [a]- coma sau moartea cerebrală, perforare digestivă, multitraumatisme, stop cardiorespirator, insuficienţă hepatică acută sau cronică	3
Risc crescut de bacteriemie	scor ≥6
Risc scăzut de bacteriemie	scor ≤2

Datele epidemiologice arată că *S. aureus* şi *E. coli* sunt speciile cel mai des izolate din hemoculturi pozitive. *S. aureus, E. coli,* enterobacteriile, *Ps. aeruginosa* şi *C. albicans* sunt în 90% cazuri patogene. Interpretarea hemoculturilor pozitive este de asemenea, dificilă în cazul streptococilor de grup viridans, *Enterococcus* şi SCN. Frecvenţa izolării SCN a crescut considerabil în ultimul timp, dar numai 10–20% din aceste izolate au semnificaţie clinică, majoritatea SCN izolaţi din hemoculturi fiind contaminanţi. *Bacillus, Corynebacterium* şi *Propionibacterium* produc bacteriemii semnificative în mai puţin de 5% din cazuri. Frecvenţa anaerobilor rămâne scăzută, mai ales la copii.

Varietatea microorganismelor ce pot fi regăsite în sânge creşte la pacienţii imunocompromişi. Speciile în cauză sunt numeroase şi cu exigenţe nutritive variate, ceea ce duce la dificultatea izolării acestora (tabelul 47).

Tabelul 47.

Agenţi patogeni implicaţi în etiologia bacteriemiilor şi fungemiilor (WHO; 2003).

Bacterii Gram negative	Bacterii Gram pozitive şi fungi
E. coli *Klebsiella spp.* *Enterobacter spp.* *Proteus spp.* *S. typhi* *Salmonella spp.* alte specii decât *S. typhi* *Ps. aeruginosa* *N. meningitidis* *H. influenzae* *Bacteroides fragilis (anaerobe)* *Brucella spp.* *Burkholderia (Ps.) pseudomallei* (în anumite zone geografice)	*Streptococi viridans* *S. aureus* *S. epidermidis* *Str. pneumoniae* *E. faecalis (grup D)* *Str. agalactiae (grup B)* *L. monocytogenes* *Cl. perfringens* *Peptostreptococcus spp. (anaerobi)* *Str. pyogenes* (grup A) *M. avium-intracelulare* (complexul Mac) la pacienţi SIDA. *M. kansasii* *M. tuberculosis* *C. albicans* *C. glabrata* *C. krusei* *C. tropicalis* *C. parapsilosis.* *Histoplasma capsulatum* *Cryptococcus neoformans* *Malassezia furfur* *Fusarium* *Penicillium.*
Bacterii cu creştere lentă şi dificilă *Brucella* *Campylobacter* *Legionella* *Mycoplasme – Ureaplasma* *Leptospira* Grupul HACEK - *Haemophilus aphrophilus, A. actinomicetemcomitans, Cardiobacterium hominis, Eikenella corrodens* şi *Kingella kingae* Streptococi deficienţi (*Abiotrophia*) *Bartonella (Rochalimaea)*	

Recoltarea probelor

Aseptizarea zonei de recoltare

Asepsia pielii se face succesiv cu alcool 70%, apoi cu un produs iodat (tinctura de iod 2% sau polividona iodată 10%) sau clorhexidină 0.5%, care este lăsat să acţioneze 1–2 minute pentru

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

obținerea efectului aseptic. Activitatea bactericidă a tincturii de iod este mai rapidă decât a polividonei. După puncția venoasă, produsul iodat potențial iritant trebuie îndepărtat cu alcool 70%.

Dezinfecția capului flaconului de hemocultură se face cu alcool 70% sau cu produs iodat.

Chiar și după o dezinfecție atentă, unele bacterii persistă în straturile mai profunde ale pielii și pot contamina proba (de exemplu, *S. epidermidis, Propionibacterium acnes*, spori de *Clostridium*). Pseudobacteriemia (hemocultură fals-pozitivă) poate rezulta și din utilizarea soluțiilor antiseptice, seringilor sau acelor contaminate. Izolarea repetată a unui microorganism neobișnuit (de exemplu, *Burkholderia (Ps.) cepacia, Pantoea (Enterobacter) agglomerans* sau *Serratia* spp.) în același spital indică suspiciunea unei infecții nosocomiale și necesitatea unei anchete epidemiologice. O altă sursă de contaminare este contactul acului cu dopurile flacoanelor nesterilizate (sau cu soluții nesterile), în cazul în care aceeași seringă este folosită inițial pentru recoltarea de sânge pentru analize chimice sau VSH.

Recoltarea prin puncție venoasă

Puncția venoasă este singura metodă fiabilă pentru prelevarea sângelui în vederea hemoculturii. Recoltarea prin cateter crește riscul contaminării.

Densitatea bacteriilor prezente în sânge este în general foarte scăzută la adult (mai mică de 1 UFC/ml). Un volum de 20 ml de sânge asigură un procent de pozitivitate a hemoculturii cu 30% mai mare, comparativ cu un volum de 10 ml care este minimum necesar la adult.

La copii, densitatea bacteriilor în sânge este mai mare decât la adult, un volum de 1–2 ml fiind considerat suficient. Acest volum poate fi crescut în funcție de vârstă (2–5 ml).

Datorită caracterului intermitent sau tranzitoriu al bacteriemiei, se recomandă recoltarea a 2–3 hemoculturi (la un interval optim de 30-60 minute). Momentul optim de recoltare este în timpul frisoanelor sau al episoadelor termice maxime. Recoltarea mai multor hemoculturi permite de asemenea demonstrarea implicării unor microorganisme comensale în etiologia bacteriemiei și excluderea posibilității contaminării probei în timpul recoltării.

Chiar în condiții ideale de recoltare a sângelui pentru hemocultură, în 3–5% din culturi pot crește contaminanți de pe piele (*S. epidermidis, Propionibacterium acnes, Clostridium spp.*, difteroizi) sau din mediul înconjurător (*Acinetobacter* spp., *Bacillus* spp.). Aceste microorganisme se pot comporta uneori ca agenți patogeni și pot cauza endocardita.

O infecție adevărată este suspectată în cazurile în care:

- același organism crește în ambele flacoane de hemocultură recoltate în același timp; același organism crește în două flacoane recoltate la intervale diferite;
- creșterea este rapidă (în 48 de ore), ceea ce înseamnă o densitate bacteriană inițială mare; două tulpini izolate aparținând aceleiași specii au același biotip și profil de sensibilitate la antibiotice.

Toate rezultatele hemoculturii trebuie raportate clinicianului, inclusiv contaminanții, cu menționarea statutului respectiv (de exemplu, *P. acnes* – comensal cutanat, *S. epidermidis* – probabil contaminant). Pentru contaminanți nu trebuie efectuată antibiograma. Identificarea a două sau mai multe specii sau tulpini poate indica o bacteriemie polimicrobiană, care poate să apară în cazul pacienților imunodeprimați sau o bacteriemie cu anaerobi (de exemplu, asocierile multispecifice dintre anaerobi și aerobi apar în bacteriemiile fulminante severe asociate cu traumatisme severe sau cu intervenții chirurgicale care implică intestinul gros).

Însămânțarea probelor

Se însămânțează 2 flacoane, pentru incubare în condiții de aerobioză și anaerobioză (pe lângă bacteriile strict anaerobe, streptococii și enterococii se dezvoltă mai rapid în condiții de anaerobioză).

Sângele conține numeroase substanțe cu activitate antimicrobiană (complement, lizozim, celule fagocitare și antibiotice), motiv pentru care, pentru hemocultură sângele este diluat 1/10 în mediul de cultură.

Mediul de cultură conține de asemenea un anticoagulant (polietanol sulfonat de sodiu – SPS), utilizat la o concentrație de 0,025–0,05%, ce favorizează creșterea majorității microorganismelor, prin inhibarea activității bactericide a serului (inhibă fagocitoza, inactivează complementul, neutralizează lizozimul și antibioticele din clasa aminoglicozidelor). SPS poate avea efect inhibitor asupra unor

specii de *Neisseria*, *Peptostreptococcus anaerobius* sau de *Streptobacillus moniliformis*. Adăugarea de gelatină în mediu la o concentrație de 1,2% poate neutraliza efectul inhibitor al SPS. Mediul de cultură conține de asemenea rășini schimbătoare de ioni, cu efect neutralizant față de antibiotice. Se recomandă realizarea prelevărilor "la distanță" față de perioada de administrare a antibioticelor.

Incubarea probelor

Flacoanele de hemocultură sunt incubate timp de 7 zile la 35^{0}C, iar în cazul sistemelor automate, 5 zile. Peste aceasta perioadă, bacteriile detectate sunt în general contaminanți care au fost prezenți în prelevat în cantitate mică. Un timp de incubare mai lung poate fi necesar pentru microorganisme particulare: levuri, fungi, bacterii din grupul HACEK, *Brucella* sau *Legionella* și pentru pacienții suspectați de endocardite, la care prelevatele au fost realizate sub tratament cu antibiotice.

Examinarea probelor

În cazul sistemelor convenționale, flacoanele se examinează zilnic sau de 2 ori/zi, în vederea observării semnelor unei creșteri vizibile.

Tabelul 48.

Examinarea macroscopică a flacoanelor de hemocultură.

Aspect macroscopic	Etiologie posibilă
Turbiditate	Bacili Gram negativi aerobi, stafilococi, *Bacteroides*
Hemoliză	Streptococi, stafilococi, *Listeria, Clostridium, Bacillus*
Producere de gaz	Bacili Gram negativi aero-anaerobi
Coagulare	*S.aureus.*

Dacă la examinarea microscopică (tabelul 48) se evidențiază stafilococi sau bacili Gram negativi, hemocultura poate fi utilizată ca inocul pentru realizarea unei antibiograme nestandardizate rapide, care poate fi citită după 6 ore, pentru a grăbi decizia terapeutică.

Detectarea precoce a creșterii microbiene în sistemele convenționale poate fi îmbunătățită prin:

- agitarea flacoanelor aerobe în timpul primelor 24 ore de incubare;
- aerarea flacoanelor aerobe cu un dispozitiv adaptat care favorizează creșterea tulpinilor de *Pseudomonas;*
- detectarea prezenței bacteriene pe frotiuri;
- repicarea sistematică precoce (între 6 și 24 ore) a flaconului de anaerobioză pe geloză chocolat incubată în aerobioză la 35°C;
- utilizarea sistemelor difazice, ce permit creșterea precoce a coloniilor pe mediul gelozat;
- concentrarea microorganismelor (centrifugare timp de 30 minute la 3000g) înainte de însămânțare pe mediul gelozat și liza elementelor figurate cu ajutorul unui agent de liză (ex. saponină). Sistemul centrifugare-liză este folosit pentru izolarea microorganismelor fastidioase, micobacteriilor, levurilor, fungilor filamentoși.

În funcție de tipurile morfologice observate se aleg mediile de repicare a hemoculturii:

- pentru bacili Gram negativi: agar MacConkey, mediu TSI, MIU, citrat Simmons;
- pentru cocobacili Gram negativi: geloză sânge;
- pentru stafilococi: geloză sânge, agar manitol sare;
- pentru streptococi: geloză sânge cu discuri de optochin, bacitracină, telurit;
- geloză cu sânge de berbec pentru testul CAMP;
- agar bilă esculină pentru enterococi.

Bacteriile tip *Neisseria*, *Haemophilus* și *Campylobacter* modifică slab sau deloc turbiditatea, iar pneumococii suferă autoliza care antrenează clarificarea mediului lichid de cultură. În acest caz se face un pasaj orb pe geloză chocolat, la 18-24 de ore de incubare sau după 7 zile de incubare, dacă hemocultura rămâne negativă, în bulion cu tioglicolat care se urmărește timp de 3 zile.

Evidențierea bacteriilor cu creștere lentă și dificilă

Brucella. Unele tulpini sunt exigente pentru atmosfera de CO_2. Sângele este inoculat în flacon difazic tip Castaneda și incubat 6 săptămâni la 37°C.

Se fac subculturi pe geloză tripticar soia cu 5% ser de bou sau pe agar *Brucella* incubat în atmosferă de 5%CO_2.

Campylobacter. Cultivare la 37°C în microaerofilie (atmosferă 5% CO_2) pe mediu Skirrow, Butzler sau Karmali incubate 72 ore.

Legionella. Cultivare pe mediu BCYE, incubare la 37°C cu 5% CO_2, examinate timp de 10 zile.

Mycoplasme – Ureaplasma. Cultivare în bulion PPLO sau geloză A3, incubare în microaerofilie la 37°C şi observate timp de 3 zile.

Leptospira. Sânge recoltat pe heparină şi însămânţat pe mediu Tween-Albumină sau EMJH, incubare la 30°C la întuneric; examinarea săptămânală a culturii la microscopul cu fond întunecat, timp de 2 luni.

Grupul HACEK – *Haemophilus aphrophilus, Actinobacillus actinomicetemcomitans, Cardiobacterium hominis, Eikenella corrodens* şi *Kingella kingae* necesită incubare timp de 14 zile.

Streptococi deficienţi (*Abiotrophia*) – necesită piridoxal (vitamina B_6) pentru creştere.

Bartonella (Rochalimaea) – sedimentul dintr-un tub de liză este însămânţat pe geloză cu sânge de iepure sau de oaie, incubată în atmosferă de 5% CO_2 timp de 6 săptămâni. Se poate identifica prin metode moleculare bazate pe PCR.

Metodele de detectare automată permit semnalizarea flacoanelor pozitive prin măsurarea directă sau indirectă a cantităţii de CO_2 produsă în flaconul de cultivare (detectare spectrofotometrică a CO_2 – **Bio Argos**, sensor de CO_2 de culoare verde, separat de bulion printr-o membrană semipermeabilă care lasă să treacă CO_2, determină scăderea valorii pH şi modificarea culorii de la verde la galben/emitere de fluorescenţă, înregistrată prin reflectometrie/fotodiodă – **BacT/Alert, Bactec 9240,** introducerea în flacoane a unor molecule care emit fluorescenţă în prezenţa fenomenelor biologice determinate de creşterea microbiană, atât producerea CO_2, cât şi variaţia pH şi modificările potenţialului oxido-reducător –**Vital).**

În endocarditele infecţioase, hemoculturile pot rămâne negative în mai mult de 10% din cazuri, chiar dacă au fost prelevate înainte de antibioterapie. În această situaţie, posibila infecţie cu *Chlamydia, Coxiella burnetti* sau *Bartonella* se poate identifica serologic. Incubarea în sistem automat de 5–7 zile este insuficientă pentru dezvoltarea tulpinilor cu creşterea lentă şi dificilă, fiind recomandată prelungirea timpilor de incubare sau repicarea flacoanelor.

În absenţa tratamentului cu antibiotice din zilele precedente, este recomandată realizarea unei prime serii de 3 hemoculturi, într-un interval de 24 ore, timpul minim dintre 2 hemoculturi fiind de o oră.

În ziua următoare, dacă hemoculturile rămân sterile, este recomandată efectuarea a 2–3 hemoculturi, diversificând mediile şi tehnicile pentru a favoriza creşterea microorganismelor fastidioase. De exemplu liza elementelor figurate permite eliberarea microorganismelor intracelulare, concentrarea şi creşterea şanselor de creştere pe medii de cultură. Acest sistem este indicat pentru izolarea levurilor, a fungilor filamentoşi şi a bacteriilor cu creştere dificilă ca *Bartonella* (*Rochalimea*). Pentru bacteriile patogene intracelulare ca *Coxiella burnetti*, tuburile pot fi trimise la centrele de referinţă.

Dacă pacientul a primit antibiotice, este recomandată utilizarea mediilor ce conţin răşini absorbante.

În cazul hemoculturilor negative este recomandat:

– începând din a 3 a zi de incubare realizarea unei colorăţii Gram şi a unei repicări din flacoanele aerobe şi anaerobe pe mediu gelozat "Chocolat Isovitalex", pentru cultivarea bacteriilor de grup HACEK şi pe mediu gelozat Columbia suplimentat cu 5% sânge de berbec pentru streptococi, cu striu de *S. aureus* pentru creşterea satelită a coloniilor de *Str. adjacens* şi *Str. defectivus*.

Mediile se incubează 2–5 zile în atmosferă de CO_2 pentru mediile repicate din flacoanele aerobe şi în condiţii de anaerobioză pentru cele repicate din flacoanele anaerobe. Poate fi realizată o subcultură pe mediu lichid, de exemplu, pe bulion cord-creier, iar în a 7-a zi de incubare se poate realiza o colorăţie Gram şi o repicare pe mediu gelozat "Chocolat Isovitalex", pentru creşterea bacteriilor de grup HACEK, incubat timp de 5 zile în atmosferă de 5–10 % CO_2 sau în anaerobioză, în funcţie de flaconul de origine.

Dacă hemoculturile sunt negative la 3 zile de la incubare, pentru *Chlamydia psittaci, Chl. pneumoniae, Chl trachomatis, Brucella, Legionella, Mycoplasma pneumoniae, Bartonella, Candida, Aspergillus, Coxiella burnetii* este recomandat examenul serologic.

BCU "CAROL I" BIBLIOTECA

Pentru diagnosticul endocarditelor se poate realiza analiza microbiologică a valvelor cardiace.

În acest scop, valva va fi recoltată într-un vas steril care nu conține nici un lichid şi va fi transmisă laboratorului. Valva este depusă într-un mojar sau alt vas steril, se examinează macroscopic, se fotografiază, după care se realizează 3 amprente pe lamă. Lamele sunt uscate şi fixate cu etanol. Se poate efectua colorație Gram, Ziehl-Neelsen, Giemsa sau acridin-orange. Aceste colorații permit punerea în evidență a majorității bacteriilor, inclusiv a micobacteriilor. Fragmentul destinat anatomopatologului poate fi plasat într-un fixator (formol diluat 1/10). Fragmentul destinat bacteriologului este mojarat într-un ml bulion creier-cord. Din amestec se realizează un frotiu colorat Gram şi se însămânțează pe:

- geloză-chocolat suplimentată cu Isovitalex, care se incubează în atmosferă de 5% CO_2 (sau sistem Gaspak) timp 10 zile. Pentru a rezista la desicare mediul se poate repartiza înclinat în tub;
- geloză-chocolat suplimentată cu Isovitalex, care se incubează în atmosferă de 5% CO_2, timp de 45 de zile între 28–32^{0}C pentru a favoriza creşterea *Bartonella;*
- 2 medii gelozate cu 5% sânge incubate una în atmosferă de O_2, alta în atmosferă de 5% CO_2 timp de 10 zile pentru streptococi. Aportul de CO_2 favorizează creşterea *Str. mutans, S. anginosus* şi *S. constellatus;*
- mediu geloză Columbia cu 5% sânge cultivat timp de 10 zile în anaerobioză pentru creşterea unor streptococi şi bacterii anaerobe;
- geloză BCYE suplimentată cu 10% ser fetal bovin incubat în atmosferă de CO_2 la 35–37°C timp de 10 zile (serul fetal bovin favorizează creşterea *Legionella micdadei* şi *L. bosemanii*);
- mediul Lowenstein şi Middlebrook conservat 6 săptămâni la 35–37°C pentru cultivarea micobacteriilor;
- un mediu lichid uşor reducător, îmbogățit şi uşor gelozat (de exemplu, mediul cord-creier, gelozat 1% şi îmbogățit cu 1–3% Isovitalex/ bulion glucozat tamponat cu ficat şi îmbogățit cu 1–3% Isovitalex, mediu Schaedler semigelozat îmbogățit cu 1–3% Isovitalex). Aceste medii sunt incubate timp de o lună la 35–37°C.

15.9. Examenul bacteriologic al dispozitivelor intravasculare (catetere, camere implantabile)

Inserția cateterelor cardiovasculare are drept obiective asigurarea unui acces vascular permanent pentru administrarea medicamentelor şi a soluțiilor parenterale, măsurarea unor parametri hemodinamici şi accesul la diferite situsuri anatomice.

Inserția cateterelor prin piele expune aceste dispozitive la riscul colonizării cu microorganisme ale microbiotei cutanate rezidente, care pot iniția o infecție asociată dispozitivului protetic. Examenul bacteriologic al acestor dispozitive este justificat în cazul unor infecții generalizate şi/sau localizate şi are ca obiective:

- evidențierea colonizării microbiene a unui cateter (tabelul 49);
- diferențierea unei colonizări de contaminarea ce are loc în general la scoaterea dispozitivului (tabelul 50): se poate recurge la metode cantitative, semicantitative sau calitative (care constau în imersarea dispozitivului în medii de cultură lichide);
- documentarea unei stări septice: se realizează sistematic hemoculturi periferice pentru evidențierea bacteriemiei şi pentru excluderea unui alt focar infecțios în afara cateterului colonizat;
- luarea unei decizii privind instaurarea unui tratament local sau general cu un anumit antibiotic sau îndepărtarea cateterului.

Microorganismele cel mai frecvent întâlnite sunt reprezentate de rezidenți ai microbiotei normale: *S. epidermidis* (şi alți stafilococi coagulazo-negativi), *S. aureus, Ps. aeruginosa, Acinetobacter ssp., enterobacterii, Enterococcus ssp.*, bacterii corineforme, *Candida sp.* Studiul bacteriilor anaerobe nu este necesar în acest context.

Tabelul 49.

Metode de analiză bacteriologică a dispozitivelor intravasculare *in situ*

Metoda centrifugare-liză (Isolator 10)	Metoda liza Isolator 1,5	Hemocultura în sistem automat
Se recoltează 2 hemoculturi (10 ml de sânge fiecare), prima de la periferie, la distanță de dispozitiv și a doua de la nivelul acestuia (după îndepărtarea primilor 20 ml de sânge). **Însămânțarea sedimentului** rezultat după centrifugare din fiecare tub, pe 2-3 placi cu geloză sânge. **Incubare** timp de 72 ore în atmosferă cu 5% CO_2. **Numărarea coloniilor** (UFC/ml). **Rezultatul este semnificativ** dacă nr. UFC/ml obținut din cateter > 5x nr. UFC/ml obținut din sângele periferic.	Aceleași etape; fără centrifugare; volume mai mici de 1,5 ml; se utilizează în pediatrie.	**Se recoltează 2 hemoculturi** (10 ml de sânge fiecare), prima de la periferie, la distanță de dispozitiv și a doua de la nivelul acestuia (după îndepărtarea primilor 20 ml de sânge). Probele se plasează în automat. Se notează momentul pozitivării celor 2 hemoculturi prelevate de pe material. **Rezultatul este semnificativ dacă** timpul de pozitivare al hemoculturii recoltate de pe cateter este mai mic decât cel al hemoculturii periferice.

Tabelul 50.

Metode de analiză bacteriologică a dispozitivelor intravasculare după scoaterea din organism

Se lucrează pe fragmente de 5 cm provenite de la extremitatea distală pentru cateterele lungi, sau pe toată lungimea cateterului pentru cateterele scurte.			
Metoda semicantitativă Maki	**Metoda cantitativă Cleri**	**Metota cantitativă Cleri modificată (Brun Buisson)**	**Analiza bacteriologică după scoaterea unei camere implantabile**
Se rulează cateterul pe suprafața unei plăci de geloză-sânge sau de mediu lactozat cu ajutorul unei pense sterile sau al unei pipete Pasteur (fig. 348); – incubare 48 ore la 37°C. Cateterul este colonizat dacă **nr. UFC/ml > 15** (5 după unii autori) Colonizarea se raportează exclusiv la suprafața externă a cateterului. Prezintă sensibilitate bună, dar specificitate redusă.	Se prinde cateterul cu o pensă sterilă și se repartizează prin orificiul său 1 ml de bulion steril; – se colectează bulionul și cateterul într-un tub steril; – vortexare 30 secunde; – însămânțare 10 µl bulion pe geloză sânge; – incubare 48 ore la 37°C. Cateterul este colonizat dacă **nr. UFC /ml >1000.** Colonizarea se raportează la suprafața externă a cateterului și la orificiul dispozitivului. Prezintă sensibilitate și specificitate bune.	Cateterul este colectat în 1 ml ser fiziologic steril; – vortexare 1 minut. Se obține același prag de pozitivitate ca în metoda precedentă.	Se recoltează serozitățile de la nivelul camerei îndepărtate din organism; – se analizează cateterul printr-o metodă cantitativă (Cleri sau Brun-Buisson); – se spală partea închisă a camerei și se analizează lichidul de spălare printr-o metodă cantitativă (Cleri sau Brun-Buisson).

Fig. 348. Cultura crescută prin rularea unui cateter colonizat cu bacterii Gram negative, lactozăfermentative (CLED).

15.10. Examenul citochimic și bacteriologic al lichidului cefalorahidian (LCR)

Examenul de laborator al LCR ajută la diagnosticul precoce al meningitei (tabelul 51) și la orientarea tratamentului. Analiza LCR are caracter de maximă urgență și prioritate.

Meningitele se pot clasifica în: meningite comunitare (ambulatorii) – stratificate pe 3 niveluri de vârstă (adulți și copii > 5 ani, sugari și copii < 5 ani, nou-născuți) și meningite nosocomiale (care survin la pacienții imunodeprimați sau cu intervenți neurochirugicale, fiind favorizate de un traumatism).

Tabelul 51.

Etiologia meningitelor

Meningite comunitare	Adulți și copii > 5 ani	Sugari și copii < 5ani	Nou-născuți
	Str. pneumoniae *N. meningitidis* *L. monocytogenes*	*Str. pneumoniae* *N. meningitidis* *H. influenzae*	*Str. agalactiae* *E. coli* *L. monocytogenes*
Meningite neurochirugicale	*S. aureus* sau *S. epidermidis* *Str. pneumoniae* *Enterobacteriaceae* *Pseudomonas* sp.		

Examenul macroscopic și citochimic al LCR (tabelele 52, 53) permite orientarea diagnosticului spre o etiologie bacteriană sau virală. Formula leucocitară nu se poate realiza pe un preparat ce conține sub 10 elemente celulare/mm^3 și este dificil de realizat sub 20 elemente celulare/mm^3.

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITARĂ

Tabelul 52.

Tipuri de LCR în funcție de caracteristicile macroscopice, citologice și biochimice.

LCR normal	LCR "tulbure"	LCR limfocitar	LCR "franc purulent"	LCR hemoragic
Aspect macroscopic "apa de stâncă" (limpede). Sub 5 elemente/ mm^3 (NB: la nou-născuți 10–30 elemente/mm^3 (50% polinucleare neutrofile). Proteinorahie normală (mai mică 0.4g/l) și glicorahie normală (mai mică de 60% față de glicemie).	Aspectul macroscopic orientează spre o meningită purulentă (200 leucocite/mm^3). Mai mult de 10 elemente/ mm^3 din care 50% polinucleare. Proteinorahie mai mare de 0.4 g/l – hipoglicorahie mai mică de 40% față de glicemie.	Mai mult de 10 elemente/ mm^3 din care 50% limfocite. Proteinorahie mai mică de 0.4 g/l. Hipoglicorahie însoțită de hipoclorurorahie (mai mică de 40% față de glicemie: se suspectează etiologie bacteriană cu *Listeria*, BK) dacă glicorahia este mai mare de 50% decât glicemia și mai puțin de 100 elemente/mm^3: se suspectează etiologie virală.	Mai mult de 10 elemente/mm^3; procente egale de polinucleare și limfocite. Proteinorahie și glicorahie normale. Se poate suspecta: listerioza, meningita purulentă sau o meningită limfocitară la debut, abces cerebral	Contaminarea LCR cu hematii se poate datora unui traumatism apărut în timpul puncției lombare sau unei hemoragii subarahnoidiene (asociată unei pleiocistoze și uneori cu hipoglicorahie). Proteinorahie = 0.1 g/l.

LCR trebuie transportat rapid la laborator (< 30 min), deoarece polinuclearele se lizează rapid (50% în 2h), iar bacteriile sensibile își pierd viabilitatea (de exemplu, meningococul), însoțit de date clinice: vârsta, dignosticul prezumtiv, tratamente cu antibiotice administrate anterior recoltării.

Tabelul 53.

Principalele caracteristici citologice, biochimice și microscopice ale LCR în funcție de etiologia meningitei (WHO, 2003).

Parametrul	Tipul de meningită			
	Bacteriană	Tuberculoasă	Fungică	Virală
Formulă leucocitară modificată cu predominanță:	PMNN	Mononucleare PMNN – stadii inițiale de dezvoltare.	Mononucleare	Mononucleare
Glucoza	Foarte scăzută 0.28–1.1mmol/l	Scăzută: 1.1–2.2mmol/l	Scăzută: 1.1–2.2mmol/l	Normală: 3.6–3.9 mmol/l
Proteinorahie	Ridicată	Ridicată	Ridicată	Ușor ridicată în stadiile inițiale ale infecțiilor.
Frotiu	Bacterii observate la colorația Gram.	Rareori pozitiv (colorația Ziehl Neelsen).	Pozitiv (Colorație cu tuș de China).	Negativ.

Formula leucocitară se realizează din sedimentul obținut după centrifugare în tuburi conice sterile, cu ajutorul unei camere de numărare, urmată de o colorație May-Grunwald-Giemsa sau eozină-albastru de metilen.

Examinarea frotiurilor colorate Gram permite orientarea rapidă a diagnosticului etiologic (prezența de coci, bacili, Gram +/– (fig. 349), prezența capsulei, localizarea intra-/extraleucocitară), corelată cu investigarea prezenței antigenelor solubile în LCR prin metoda latex-aglutinarii.

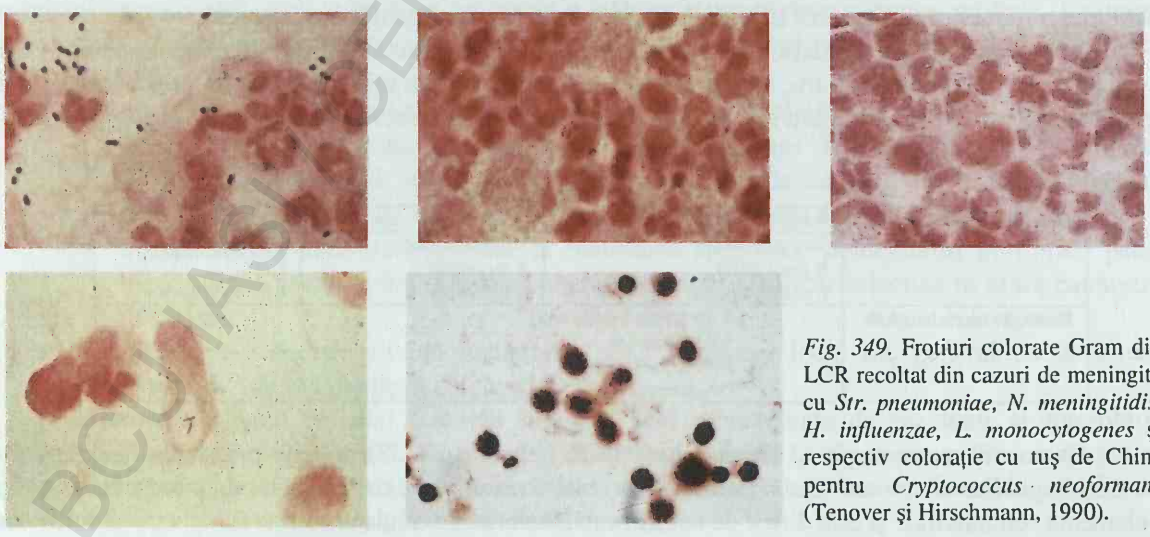


Fig. 349. Frotiuri colorate Gram din LCR recoltat din cazuri de meningită cu *Str. pneumoniae, N. meningitidis, H. influenzae, L. monocytogenes* și respectiv colorație cu tuș de China pentru *Cryptococcus neoformans* (Tenover și Hirschmann, 1990).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Diagnosticul orientativ rezultat după examinarea microscopică, biochimică şi serologică este transmis urgent clinicianului.

Evidenţierea bacteriilor dupa coloraţia Gram permite realizarea unei antibiograme utilizând ca inocul direct LCR (dacă este în cantitate suficientă).

Cultivarea

LCR se însămânţează pe medii îmbogăţite care permit creşterea bacteriilor cu exigenţe nutritive: geloza sânge (pentru *Listeria,* coci Gram pozitivi) sau geloza sânge suplimentată cu factori de creştere, geloză sânge cu striu de *S. aureus* (pentru *H. influenzae),* cu disc de optochin (pentru *Str. pneumoniae*) incubate la 37°C în atmosferă de 5–10% CO_2, medii pentru anaerobi, incubate la 37°C în anaerobioză, bulion cu extract globular (facultativ) ce permite diluarea antibioticului prezent în LCR, geloza Sabouraud (în meningita limfocitară la imunodeprimaţi SIDA), mediu MacConkey (pentru enterobacterii şi alţi bacili Gram negativi fără exigenţe nutritive).

Mediile vor fi observate după 18–48 ore de incubare la 37°C şi timp de 5 zile.

Examinarea morfologiei coloniilor, afinităţii tinctoriale pentru coloranţii Gram, testul oxidazei şi catalazei permit orientarea diagnosticului şi alegerea galeriei de identificare, a tehnicilor de testare a antibiosensibilităţii şi a metodelor de tipizare. Pentru bacilii Gram negativi şi *S. aureus,* se realizează antibograma. În cazul *H. influenzae* se recomandă investigarea β-lactamazelor, pentru *N. meningitidis* investigarea β-lactamazelor care poate apărea în cazuri excepţionale, investigarea sensibilităţii scăzute la penicilina G prin măsurarea diametrului zonei de inhibiţie în jurul discului de oxacilină şi prin determinarea CMI, serogruparea, trimiterea către un centru de referinţă, pentru *Str. pneumoniae* detectarea rezistenţei la β-lactamice cu ajutorul discului de oxacilină şi determinarea CMI la penicilina G, amoxicilină, cefotaxim şi ceftriaxonă (fig. 350). Pentru *L. monocytogenes* şi *Str. agalactiae* nu se recomandă antibiograma, datorită conservării sensibilităţii acestora la benzil-peniciline.

În cazul unui LCR limfocitar cu hiperproteinorahie, hipoglicorahie şi hipoclorurahie se suspectează o meningită tuberculoasă şi se urmăreşte investigarea BAAR prin examen microscopic, însămânţarea pe medii de cultură specifice pentru *M. tuberculosis* şi confirmare moleculară.

Creşterea pe medii de cultură poate rămâne negativă în cazul unei meningite purulente aseptice, rezultat ce se poate datora unui tratament cu antibiotice sau unei etiologii bacteriene cauzate de o bacterie fastidioasă.

În cazul aspectului şi biochimiei normale a LCR, prezenţa cîtorva colonii izolate de coci Gram pozitivi sugerează o contaminare a LCR în momentul prelevării. Totuşi, aceste colonii se vor identifica şi se vor raporta.

Pe baza indicaţiilor clinice, se vor realiza examinări complementare privind investigarea prezenţei unor amoebe libere (*Naegleria fowleri*) sau a unor protozoare flagelate (*Tripanosoma*) prin microscopie cu contrast de fază sau pe frotiu colorat Giemsa, examinarea preparatului proaspăt cu tuş de China pentru evidenţierea capsulei la *Cryptococcus neoformans,* detectarea prin amplificare genică a bacteriilor cu creştere lentă: *M. tuberculosis, Leptospira, Borelia.*

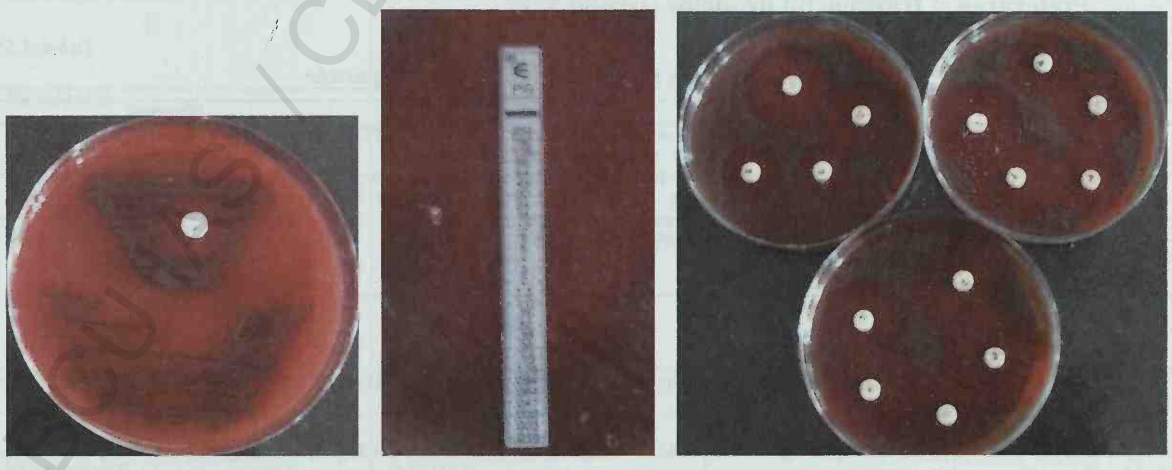


Fig. 350. Testul sensibilităţii la optochin la *Str. pneumoniae*, antibiograma difuzimetrică, şi determinarea CMI la penicilină prin E-test.

15.11. Examenul bacteriologic al lichidelor de puncţie (lichide purulente, serozităţi)

Contaminarea microbiană a lichidelor interne (lichid de puncție articulară sau sinovială, lichid pleural, lichid peritoneal, lichid de ascită, lichid pericardic, chisturi tegumentare) care în mod normal sunt sterile, determină infecții cu un nivel ridicat de morbiditate şi mortalitate.

În consecință, metodele de izolare şi caracterizare a speciilor bacteriene izolate din aceste situri trebuie să fie performante, rapide şi eficiente, în vederea instituirii cât mai rapide a unui tratament țintit.

Bacteriile izolate din aceste infecții pot fi aerobe, facultativ anaerobe sau strict anaerobe (tabelul 54).

Tabelul 54.

Etiologia infecțiilor cavităților sterile ale organismului.

Supurație hepatică	*Enterobacteriaceae* Anaerobi *Str. "milleri"* *S. aureus* *Enterococcus* sp.
Peritonita primară	*Str. pneumoniae* *E. coli*
Peritonita secundară (infecție biliară sau abces)	*Enterobacteriaceae* Streptococi Anaerobi *Enterococcus* spp.
Supurație intestinală	*Yersinia pseudotuberculosis* *Y. enterocolitica* *Salmonella* spp *Str. "milleri"*
Peritonita post-chirurgicală	*Enterobacteriaceae* *Enterococcus* spp Anaerobi
Pleurezie	*Str. pneumoniae* *S. aureus* *H. influenzae* Anaerobi
Osteomielita la copil	*S. aureus*
Osteomielita şi spondilodiscita	*S. aureus* *Enterobacteriaceae* *Ps. aeruginosa*
Artrita profundă	*S. aureus* *N. gonorrhoeae* *Enterobacteriaceae* *Streptococcus* spp. *H. influenzae* *Borrelia burgdorferi* *Ps. aeruginosa*
Infecții ale protezelor articulare	*S. aureus* Stafilococi coagulază-negativi *Peptostreptococcus.*

Prelevarea şi transportul probelor (tabelul 55)

Tabelul 55.

Metode de recoltare şi transport al lichidelor de puncție

Produs patologic	Prelevare	Transport	Observații
Lichide interne (pericardic, pleural, abdominal, articular, de puncție).	Condiții anaerobe: cu seringa, fără bulă de aer şi ermetic (≥ 3ml), într-un tub steril pentru examenul bacteriologic sau într-un tub cu anticoagulant pentru examenul citologic. Este necesară recoltarea în condiții aseptice pentru a evita contaminarea probelor cu microbiotă comensală. Uneori lichidul recoltat poate fi utilizat.	Mai scurt de 30 min., la 20°C. Pentru investigarea gonococului se foloseşte ca mediu de transport geloza Stuart.	Hemoculturile se prelevează înainte de tratamentul cu antibiotice. Trebuie obținută o cantitate suficientă, deoarece densitatea inoculului poate fi redusă. Dacă volumul de lichid recoltat este mic, acesta se inoculează direct într-un flacon de hemocultură.

Examenul direct:

- în situația unei cantități mici de lichid (sau în cazul punctiei chiştilor) se realizează un frotiu colorat Gram;
- în situația unei cantități suficiente de lichid se realizează un frotiu colorat Gram şi formula elementelor figurate.

Cultivarea

- concentrarea probei prin centrifugarea lichidelor interne la 1500g / 30 minute (prin expunere la O_2 există riscul distrugerii anaerobilor şi al contaminării probei);
- însămânţare în:
  * bulion îmbogăţit (tip cord – creier), incubare în anaerobioză la 37°C (în medie 4 zile, iar pentru lichidele articulare 10 zile), cu observare zilnică;
  * bulion pentru anaerobi şi geloză sânge incubată în anaerobioză;
  * geloza sânge, mediu selectiv pentru bacterii Gram negative, geloza chocolat incubată în atmosferă de CO_2 la 35°C;
  * în funcţie de context:
    - geloza BCYE pentru *Legionella;*
    - mediu cu Tween pentru corinebacterii;
    - mediu Sabouraud pentru levuri, *Aspergillus* (incubare la 22–30°C);
    - mediu pentru *Mycobacterium* (incubare 8 săptămâni);
    - mediu de cultură pentru *Nocardia* (10 zile).

Interpretarea creşterii presupune analiza comparativă a rezultatelor obţinute prin cultivare în aerobioză şi respectiv, anaerobioză. Mediile solide sunt examinate la 24h şi 48h. Mediile lichide sunt incubate timp de minimum 10 zile (pozitivarea culturii demonstrează existenţa unei infecţii, dar absenţa culturii se poate datora existenţei bacteriei în cantităţi reduse/necultivabile în produsul recoltat).

Prezenţa unei culturi mixte (>3 specii microbiene, nici unul nefiind predominant) impune identificarea tuturor speciilor izolate, realizându-se o corelaţie cu simptomatologia pacientului.

Se recomandă realizarea antibiogranei pentru speciile izolate şi determinarea valorii CMI pentru moleculele folosite frecvent în tratamentul acestor infecţii.

15.12. Analiza microbiologică a exsudatelor purulente, a secreţiilor de plagă şi a abceselor

Unul dintre procesele cele mai frecvent asociate bolilor infecţioase este producerea unei secreţii purulente (uneori seropurulente) ca rezultat al invaziei bacteriene într-o cavitate, ţesut sau organ (tabelul 56). Exsudatul este format din leucocite, predominant polimorfonucleare, microorganisme, limfă şi fibrină.

Comunicarea între clinician şi microbiolog este deosebit de importantă în diagnosticul şi tratamentul pacienţilor cu infecţii supurative. Microbiologul trebuie să colaboreze cu medicul pentru a asigura prelevarea corectă a produsului patologic şi transportul rapid la laborator. Dacă este posibil, tampoanele de bumbac ar trebui să fie evitate.

Tabelul 56.

Etiologia infecţiilor supurative cu diferite localizări

Situsul anatomic	Etiologii posibile	Produs patologic
Cavitatea peritoneală	Bacterii Gram negative enterice Enterococi Bacili Gram negativi anaerobi (*Bacteroides fragilis*) Clostridii.	Produs recoltat chirurgical
Abcese închise	Coci Gram pozitivi Bacili Gram negativi Bacterii anaerobe Amoebe	Puroi recoltat chirurgical sau prin puncţionare cu seringa
Abcese fesiere la locul injectării profunde intramusculare a preparatelor injectabile.	*Mycobacterium fortuitum-chelonei*	
Ganglioni limfatici.	*Mycobacterium tuberculosis* Alte micobacterii Stafilococi Streptococci Enterobacterii Micoze sistemice sau cutanate (histoplasmoza, sporotricoza)	Biopsii, aspirate
Abcese subcutanate	Streptococci Stafilococi	
Ulcer de decubit	Enterobacterii	Exsudate recoltate într-o seringă sau într-un recipient steril Biopsie
Ulcere cutanate	M. ulcerans M. marinum	

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Arsuri de gradul II şi III	*Ps. aeruginosa* Stafilococi	Exsudate recoltate într-o seringă sau într-un recipient steril
Plăgi traumatice, împuşcate, înjunghiate, muşcături de animale, zgârieturi	*Cl. tetani* *Cl. botulinum* *B. anthracis* *Pasteurella multocida*	Secreţii plagă recoltate într-o seringă sau într-un recipient steril
Plăgi operatorii	*S. aureus* *E. coli* *Bacteroides fragilis* *Cl. perfringens*	Secreţii plagă, lichid de drenaj recoltate într-o seringă sau într-un recipient steril
Infecţii postoperatorii (intervenţii chirurgicale stomatologice, ORL)	Actinomicoza (puroi cu aspect de granule de sulf)	Secreţii plagă, lichid de drenaj recoltate într-o seringă sau într-un recipient steril

Examinarea macroscopică

Se examinează aspectul leziunii, prezenţa gazului, culoarea puroiului care variază de la verde-galben la maro-roşu (sânge sau hemoglobină). Aspiratul dintr-un abces primar hepatic amoebian are o consistenţă gelatinoasă şi culoare maro închis gălbui. Puroiul din rănile postoperatorii sau traumatice poate fi albastru-verde datorită pigmentului piocianină produs de *Ps. aeruginosa*.

Consistenţa puroiului poate varia de la lichid tulbure la una foarte vâscoasă şi lipicioasă. Puroiul provenit din sinusuri trebuie inspectat pentru prezenţa granulelor galbene, mici, cu aspect de "sulf", care sunt formate de filamentele de *Actinomyces israelii*. Prezenţa granulelor mici de diferite culori (alb, negru, roşu, sau maro) este tipică pentru micetom şi tumori granulomatoase. Puroiul din leziunile TBC are consistenţă cazeoasă. Mirosul neplăcut, fetid, este revelator pentru infecţii cu bacterii anaerobe sau pentru infecţiile mixte aerobe-anaerobe.

Examinarea microscopică

Examinarea frotiurilor colorate Gram este obligatorie. În cazuri speciale, sau la cererea clinicianului, se examinează frotiuri colorate Ziehl-Neelsen.

Frotiurile se fac prin prelevare cu ansa a materialului reprezentativ sau prin descărcarea uşoară a tamponului fără presare excesivă sau frecare.

Se examinează:

- prezenţa şi cantitatea (apreciere semicantitativă +, ++, +++, ++++) următoarelor componente:
- granulocitele polimorfonucleare;
- coci Gram pozitivi aranjaţi în grămezi – stafilococi;
- coci Gram pozitivi în lanţuri – streptococi sau enterococi;
- bacili Gram negativi (*E. coli, Klebsiella, Proteus, Serratia, Pseudomonas spp, Bacteroides* spp.);
- bacili mari, drepţi, Gram pozitivi cu capete pătrate – *Cl. perfringens, B. anthracis*;
- microbiotă mixtă anaerobă;
- *Candida* sau alte levuri, pseudofilamente sau filamente miceliene.

La cerere se poate executa şi un preparat proaspăt lamă/lamelă în KOH 10% în cazul suspiciunii unei infecţii fungice sau parazitare.

Însămânţarea produselor patologice

Se însămânţează o buclă de ansă sau câteva picături de produs patologic pe:

- placă de geloză sânge pentru izolarea de stafilococi şi streptococi;
- placă de agar MacConkey pentru izolarea bacteriilor Gram negative;
- un tub de bulion, care poate servi ca mediu de îmbogăţire atât pentru aerobi, cât şi pentru anaerobi (de exemplu, bulion tioglicolat);
- agar manitol pentru streptococci;
- disc de bacitracină pentru *Str. pyogenes;*
- agar Sabouraud pentru fungi;
- mediu Löwenstein-Jensen pentru probele BAAR pozitive;
- puroiul de la pacienţii cu artrită, pleurită, osteită, sau celulită, în special de la copiii sub 5 ani, este inoculat pe o geloză chocolat pentru izolarea *H. influenzae*;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

– incubarea plăcilor la 35°C, în exicator sau în anaerobioză strictă dacă aspectul microscopic este de microbiotă mixtă anaerobă, timp de minimum 48 de ore şi maximum 1–2 săptămâni.

Dacă se obţine creştere doar în bulionul de îmbogăţire, frotiurile colorate Gram vor orienta alegerea mediilor de cultură folosite pentru repicare. Din fiecare tip de colonie se face un frotiu şi se colorează Gram, care se examinează microscopic.

Stafilococii formează pe geloză – sânge colonii opace, alb-crem, cu diametrul de 1–2 mm, catalază pozitive. Speciile de stafilococ de importanţă medicală, *S. aureus, S. epidermidis* şi *S. saprophyticus* se diferenţiază pe baza testului coagulazei, acidifierii manitolului, producerii de pigment şi sensibilităţii la novobiocină.

Pasteurella multocida se prezintă sub forma unor cocobacili foarte mici, Gram negativi, imobili care se dezvoltă bine pe geloză sânge la 35°C, dar este complet inhibată de săruri biliare conţinute de agarul MacConkey. După incubare peste noapte, formează pe geloză sânge colonii mici, nehemolitice, translucide şi mucoide. Fermentează glucoza fără producere de gaz, este slab pozitivă pentru reacţia oxidazei, catalază pozitivă, reduce nitraţii la nitriţi, este ureazo-negativă, indol-pozitivă.

Bacillus anthracis este un bacil aerob, sporulat, Gram pozitiv care produce pe geloză sânge colonii mari, plate, gri, de până la 5 mm în diametru, cu o textură rugoasă şi margini neregulate, cu aspect de cap de meduză. Spre deosebire de alte specii saprobionte, este nehemolitic, foarte sensibil la benzilpenicilină şi imobil.

Administrarea substanţelor antimicrobiene nu este suficientă pentru tratamentul infecţiilor supurative, tratamentul chirugical (incizie, drenaj şi debridare) fiind, în general, mai important. Testarea sensibilităţii la antibiotice nu este necesară pentru microrganismele cu sensibilitate la peniciline, cum sunt streptococii, *Pasteurella* şi *Actinomyces*, dar se recomandă pentru *Enterobacteriaceae*, bacili Gram negativi non-fermentativi şi stafilococi.

15.13. Examenul bacteriologic al lichidului de dren

Analiza bacteriologică a unui lichid de dren se poate practica în scopul supravegerii unui situs în mod natural steril. Această practică este curentă, dar nevalidată clinic, fiind de un interes discutabil. Abordarea permite analiza produselor recoltate din sisteme de drenaj închise, diferenţierea colonizării dispozitivului de contaminarea ce are loc la situsul de inserţie sau pe traseul drenului (prin analiza comparativă calitativă şi cantitativă a microbiotei obţinute cu cea de la nivelul situsului de colectare).

Dacă proba este pozitivă trebuie demonstrată natura infecţiei: localizată sau generalizată (în acest ultim caz hemoculturile sunt pozitive).

Lichidele de dren se examinează direct pe frotiuri colorate Gram realizate din produsul patologic sau după concentrare prin centrifugare şi se însămânţează pe geloză-sânge incubată în aerobioză. Antibiograma nu este obligatorie.

15.14. Examenul bacteriologic al prelevatelor oculare

Scopul analizei microbiologice a acestor produse (tabelul 57) este diagnosticul etiologic al infecţiilor oculare prin izolarea agentului etiologic şi prevenirea infecţiilor post-operatorii prin studiul microbiotei conjunctivale.

Infecţiile oculare pot afecta diferite structuri ale ochiului, fiind localizate la nivelul segmentului anterior: conjunctivite, keratite (supurative, micotice), uveite anterioare/iridociclite; posterior: corioretinite, retinite, endoftalmite, panoftalmite sau pot fi infecţii perioculare.

Etiologia infecţiilor oculare poate varia în funcţie de vârstă, status imunitar (imunodeficienţă) şi zona geografică.

Examenul pre-operator previne apariţia infecţiilor postoperatorii cu bacterii comensale sau patogene prezente în microbiota conjunctivală (tabelul 58). Microbiota normală conjunctivală cuprinde: stafilococi coagulazo-negativi ~94%, corinebacterii, neisserii nepretenţioase, streptococi, hemofili, fungi saprobionţi, *S. aureus*. Infecţiile pre-operatorii sunt produse în proporţie de 25–30% de bacterii patogene, cele mai frecvente fiind cele Gram pozitive (75–80%) (tabelul 59).

Tabelul 57.

Recoltarea şi transportul produselor oculare (adaptat după REMIC, 2008; Buiuc şi Neguţ, 2009).

Tipuri de infecţii	Momentul prelevării	Recoltarea probelor	Transportul probelor
Prelevate conjunctivale	Pre-operator, înainte de intervenţia chirugicală.	Cu tampoane umectate în ser fiziologic steril sau micropipete de pe suprafaţa conjunctivei si/sau din unghiul intern al ochiului Se recoltează cel puţin 2 tampoane (pentru frotiu şi însămânţări)	Transport: ≤2 h la temperatura camerei. În cazul în care examinarea prelevatelor nu se poate realiza imediat se folosesc medii de transport: mediu pentru *Chlamydia*, mediu Stuart pentru alte specii bacteriene
Blefarite	Pentru diagnostic, înainte de toaleta locală	1–2 cruste palpebrale, cu pensa sterilă	
Orgelet		Puroiul se prelevează cu un ac de seringă steril.	
Dacriocistită (inflamaţia glandelor lacrimale, cu obstrucţia canalelor lacrimale)		Puroiul se prelevează de la nivelul glandelor lacrimale palpebrale, prin presarea sacilor lacrimali	
Ulcer corneean		Cu tampon după efectuarea unei anestezii locale.	

Examenul direct

Nu se realizează pentru produsele recoltate pre-operator !

Pentru produsele recoltate în scopul diagnosticului unei infecţii:

1. frotiu colorat Gram – permite descrierea microbiotei dominante;
   - o absenţa microorganismelor pledează pentru o etiologie virală (adenovirusuri, virusuri herpetice, virusul Epstein Barr);
   - frotiu colorat Giemsa – permite descrierea aspectelor citologice (prezenţa polimorfonuclearelor);
   - imunofluorescenţă pentru evidenţierea bacteriei *Chl. trachomatis*;
   - preparat proaspăt pentru evidenţierea amoebelor libere la pacienţii purtători de lentile de contact.

Cultivare

În contextul general se utilizează geloza sânge/ chocolat incubată în atmosferă de CO_2, la 35°C.

În contexte clinice şi epidemiologice particulare:

- culturi de celule pentru izolarea *Chl. trachomatis;*
- bulion /geloză sânge incubate în anaerobioză;
- mediu Sabouraud pentru levuri şi *Aspergillus*, incubare la 22–30°C;
- medii de cultură specifice pentru *Mycobacterium* şi *Nocardia* (incubare 8 săptămâni în atmosferă de CO_2 la 35°C);
- medii de cultură pentru amoebe libere.

Antibiograma

Atât în cazul produselor recoltate pre-operator, cât şi în cazul celor recoltate în scop diagnostic, antibiograma se realizează numai pentru bacteriile cu potenţial patogen (tabelul 58).

Tabelul 58.

Principalele specii bacteriene cu potenţial patogen izolate din prelevatele conjunctivale pre-operatorii (REMIC; 2008).

Bacterii Gram pozitive	Potenţial patogene	*S. aureus, Str. pneumoniae, Enterococcus faecalis*
	Comensale	*S. epidermidis, Corynebacterium* sp. *Propionibacterium acnes, Streptococcus* spp. Predomină la pacienţi imunodeprimaţi
Bacterii Gram negative	Potenţial patogene	Enterobacterii (*Serratia, Klebsiella, Proteus, Enterobacter*), *Ps. aeruginosa, Haemophilus, Moraxella, Acinetobacter.* Predomină la purtătorii de lentile de contact
	Comensale	*Moraxella catarrhalis, Neisseria* spp.

Tabelul 59.

Principalii agenţi etiologici ai infecţiilor oculare (adaptat după REMIC, 2008; Buiuc şi Neguţ, 2009).

Localizare	Context general	Context particular
Conjunctivita (Inflamaţia conjunctivei)	*S. aureus, Str. pyogenes, Str. pneumoniae, H. influenzae, N. gonorrhoeae, Moraxella* spp., enterobacterii	**Adult imunodeprimat:** *Pseudomonas*, enterobacterii, levuri. **Persoane vârstnice şi copii:** *N. gonorrhoeae, S. aureus, Str. pyogenes, Chl. trachomatis, Ps. aeruginosa.* **Africa şi ţări în curs de dezvoltare:** *M. tuberculosis, C. diphtheriae, N. gonorrhoeae, Haemophilus aegyptius, Chl. trachomatis* (trachom-serotipurile A, B şi C şi conjunctivită cu incluzii – serotipurile D şi K).
Celulite profunde (inflamaţia tegumentului şi a ţesutului subcutanat adiacent cu localizare periorbitară)	*S. aureus, Str. pyogenes, Str. pneumoniae, Ps. aeruginosa*	Copii <5ani : *H. influenzae* Imunodeprimaţi sau diabetici: bacterii anaerobe şi levuri
Celulite cronice	*S. aureus, Str. pyogenes, Str. pneumoniae, Ps. aeruginosa, Mycobacterium, Nocardia, Actinomyces, Aspergillus*	
Dacrioadenite şi dacriocistite	**Profunde:** *S.aureus, S. pyogenes, S. pneumoniae, H.influenzae*	**Cronice:** *M. tuberculosis, M. leprae Nocardia, T. pallidum,* levuri.
Canaliculite (infecţii cronice ale orificiului lacrimal şi ale canalelor lacrimale).	*Propionibacterium propionicus*	
Blefarite (inflamaţia marginii libere a pleoapelor)	*S. aureus, S. epidermidis,* uneori *Moraxella* spp.	Demodex
Keratite (inflamaţia corneei)	*S. aureus, Str. pneumoniae, Ps. aeruginosa, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, Proteus,* uneori micobacterii atipice, levuri, *Aspergillus.*	Purtători de lentile de contact: amoebe libere, *Acanthamoeba, Naegleria*
Endoftalmite (inflamaţii ale ţesuturilor intraoculare)	Aceleaşi microorganisme ca şi în cazul keratitelor, la care se adaugă: *N. meningitidis, Bacillus cereus,* enterococi, SCN şi levuri	

BCU IAŞI CENTRALĂ UNIVERSITY LIBRARY

15.15. Examenul bacteriologic al prelevatelor perinatale

Contaminarea perinatală se poate produce *in utero*, la naştere sau imediat după naştere.

În cursul dezvoltării intrauterine, fătul este contaminat pe cale transplacentară, dacă mama prezintă bacteriemie cu specii care pot traversa placenta (de exemplu, *L. monocytogenes*, *T. pallidum*), consecinţele fiind totdeauna severe (avort, naştere prematură, malformaţii, sindrom infecţios congenital).

Infecţiile neonatale sunt contactate în timpul naşterii, la trecerea prin căile genitale ale mamei. Colonizarea masivă cu specii patogene sau comensale din microbiota genitală a mamei (*Chlamydia, N. gonorrhoeae, T. pallidum, Str. agalactiae* grup B, *E. coli* K1, *H. influenzae* biotip 4, *H. haemolyticus, S. aureus, Streptococcus spp, Enterococcus spp,* enterobacterii, *Gardnerella vaginalis,* specii strict anaerobe, *Mycoplasma, Ureaplasma*) poate conduce la apariţia unor procese infecţioase severe, manifestate mai ales la nivelul tractului respirator. La etiologia bacteriană, se adaugă cea virală (virusuri herpetice, virusuri hepatitice).

Infecţiile post-natale sunt dominate de semne meningeale, fiind rezultatul contaminării în primele 8 ore după naştere cu microorganisme din mediu sau din microbiota mamei.

Prognosticul infecţiilor nou-născutului este dependent de rapiditatea administrării tratamentului.

Decizia terapeutică se ia la naştere, sau uneori chiar înainte, pe baza unor argumente anamnestice, clinice, biologice şi bacteriologice (tabelul 60).

Tabelul 60.

Produse patologice analizate pentru diagnosticul sau prevenirea infecţiilor nou-născutului.

Aspirat gastric	Probe din orificii şi cutanate	Meconiu	Placentă	Lichid amniotic	Endocol	LCR Hemocultură Urină Secreţii vaginale
Câţiva ml de lichid gastric – prin aspiraţie cu ajutorul unei sonde gastrice nr. 8 montată pe o seringă de 10 ml.	1–3 tampoane din situsuri cutanate şi orificii (pliuri bucale, nas şi conduct auditiv), transportate la temperatura camerei, pe mediu de transport tip Stuart.	Recoltat în primele 24 de ore de la naştere, cu ajutorul unei spatule sterile (câţiva ml).	Prelevare cu ajutorul unui scalpel steril dintr-o zonă cu aspect macroscopic anormal.	În caz de rupere precoce a apei. Considerat un prelevat din situs steril. Recoltare după curăţarea corectă a exocolului (0,5 ml).	Prelevat de endocol realizat corect (fără contaminare vaginală) la ultimul consult înainte de data naşterii. Recoltare după curăţarea exocolului cu tampon şi AFS	Vezi capitolele dedicate produselor patologice respective
Str. agalactiae, E. coli (K1), H. influenzae, L. monocytogenes	*Str. agalactiae, E. coli (K1), H.influenzae, L. monocytogenes*	*Str. agalactiae, E. coli (K1), H.influenzae L. monocytogenes*	*Str. agalactiae, E. coli (K1), H. influenzae, L. monocytogenes*	Enterobacterii, streptococi, *Listeria, Haemophilus, Gardnerella,* alte bacterii aerobe şi anaerobe comensale ale căilor genitale.	Diagnosticul infecţiilor corioamniotice ascendente: *Str. agalactiae, E. coli (K1), H. influenzae, L. monocytogenes*	*Str. agalactiae, E. coli (K1), H. influenzae, L. monocytogenes.*

Transportate la temperatura ambiantă în maxim o oră de la naştere.
Însoţite de detalii clinice, ora naşterii şi a prelevării probei.

Examinarea directă
- frotiuri colorate Gram informative în cazul produselor sterile (aspirat gastric, meconiu);
  - prezenţa unei microbiote monomorfe pledează pentru o infecţie;
  - prezenţa unei microbiote abundente şi polimorfe pledează pentru contaminare în timpul recoltării sau transportului.

Cultivare
- mediu îmbogăţit (geloză cu sânge tratat termic);
- mediu selectiv pentru streptococi şi *Listeria* (geloza sânge şi acid nalidixic-colistin sau ANC);
- mediu selectiv pentru bacili Gram negativi;
- mediu solid pentru strict anaerobi din lichidul gastric.

Mediile sunt incubate 48 ore la 37°C, iar în cazul mediului cu sânge, în atmosferă de 5-10% CO_2

Antibiograma
Se recomandă pentru bacteriile patogene:
- *E. coli* K_1: fenotipuri de rezistenţă dobândită;
- *Str. agalactiae*: rezistenţa la macrolide şi cicline;
- *H. influenzae*: prezenţa de β-lactamaze;
- *Listeria*: rezistenţa naturală la cefalosporine, rezistenţa dobândită la macrolide, fluoroquinolone, cotrimoxazol

Observaţii:
Trebuie identificate speciile cu risc, considerate patogene
Prezenţa unei specii dominante în 2 prelevate din situsuri diferite este considerată semn de infecţie
Tulpinile de *Listeria* sunt trimise la centrul de referinţă
Determinarea grupului capsular K_1 de *E. coli* se face prin aglutinare pe lamă

15.16. Izolarea şi identificarea bacteriilor anaerobe

În patologia infecţioasă cu bacterii anaerobe etiologia este reprezentată de specii anaerobe rezidente ale ţesutului cutanat (*Eubacterium, Propionibacterium, Peptostreptococcus*), ale cavităţii bucale (*Porphyromonas, Bacteroides, Peptostreptococcus, Fusobacterium, Veillonella, Actynomyces, Bifidobacterium*), tractului respirator, mucoasei vaginale (*Lactobacillus* +++, *Prevotella sp., Prevotella pigmentes, Prevotella disiens, Peptostreptococcus ssp.*), colonului (*Bacterioides grup fragilis* +++, *Bilophila wadworthia, Peptostreptococcus ssp., Clostridium spp., Bifidobacterium spp., Eubacterium spp.*) (tabelul 61). Ea include abcese cerebrale, infecţii oculare, sinuzite, infecţii bucale şi dentare, complicaţii ale anginei Vincent, actinomicoze, infecţii pleuropulmonare, endocardite, abces hepatic, septicemie (5-10% din hemoculturi sunt pozitive pentru anaerobi), infecţii intraabdominale, colite pseudomembranoase, peritonite, infecţii de tract genital, mionecroze, supuraţii închise (cu miros fetid), infecţii situate în vecinătatea mucoaselor (bucală, anală, genitală), cu supuraţie cu aspect granular de culoare galbenă, infecţii secundare apărute după muşcături, injecţii intramusculare, traumatisme, intervenţii chirurgicale la nivelul tractului digestiv, căilor genitale, de ortopedie, toxiinfecţii sau intoxicaţii. În mai mult de 80% din cazuri, infecţiile sunt mixte, cu bacterii aerobe sau aero-anaerobe şi strict anaerobe. Cea mai mare parte dintre aceste bacterii se dezvoltă lent.

Tabelul 62.

Frecvenţa de izolare a diferitelor specii de anaerobi în supuraţiile mixte.

	Supuraţii abdominale	Secreţii purulente genitale	Pneumonie ab ingestis	Abcese pulmonare, pleurezii purulente	Infecţii supurative în sfera ORL	Ţesuturi moi
Bacteroides fragilis	+++	(+)	/	+	(+)	+
Bacteroides grup fragilis	++	(+)	(+)	+	(+)	+
Prevotella bivia	/	+++	/	0	0	
Prevotella oralis	/	+	+++	+++	++	+
Porphyromonas spp.	/	+	(+)	(+)	+	++
Fusobacterium nucleatum	/	+	++	+++	++	/
Fusobacterium necrophorum	/	/	/	/	++	/
Peptostreptococcus spp.	+	++	++	++	++	++
Actinomyces spp.	/	++	+	++	++	(+)
Cl. perfringens	++	/	+	/	0	+

+++ tulpini izolate în majoritatea cazurilor din produsele patologice respective;
+ şi ++20–80%;
(+)10–20%.

Prelevarea produselor patologice pentru diagnosticul bacteriilor anaerobe

Recoltarea trebuie precedată de dezinfecţie cu iod, apoi cu alcool 70%, urmată de puncţionarea focarului de infecţie cu seringă sau pipetă Pasteur, sau cu chiureta în profunzime, evitând formarea bulelor de aer; recoltarea este de preferat să se facă în laborator, în caz contrar, proba se introduce într-un flacon cu mediu de transport pentru anaerobioză (mediu ce conţine un gaz fără O_2, mediu gelozat – Portagerm, TGVanaerob, Port A Cul sau soluţie tampon care permite supravieţuirea bacteriilor în anaerobioză mai mult de 48 de ore şi un indicator de anaerobioză, de exemplu, rezasurina) sau într-o seringă închisă la ambele extremităţi. Recoltarea cu tamponul este interzisă.

În laborator, anaerobioza poate fi asigurată cu mai multe dispozitive: gaz-vacuum (2 ore), saci de anaerobioză, din plastic, închişi ermetic, jar cu anaerobioză (15 minute), cameră cu anaerobioză (cu atmosferă 5:15:80/H_2:CO_2:N_2 sau cu catalizator de Pd). Este necesară verificarea anaerobiozei cu un indicator oxido-reducător (bandă de hârtie de filtru impregnată cu albastru de metilen sau rezasurină).

Etapele diagnosticului microbiologic

La *examenul macroscopic* se poate constata supuraţie (abces submaxilar sau cervical, pleurezii purulente, peritonite, abcese genitale), cu aspect de granule de S, cu miros neplăcut datorită produşilor finali de metabolism, fluorescenţă roşie, ţesuturile sunt necrotice datorită pigmenţilor produşi de bacilii Gram negativi pigmentaţi.

La *examenul microscopic* coloraţia Gram variabilă este sugestivă pentru o infecţie cu bacterii anaerobe. Examenul microscopic al frotiului realizat direct din produsul patologic evidenţiază microorganisme sporulate sau un polimorfism accentuat, iar culturile incubate în aerobioză rămân sterile.

În funcţie de morfologie şi afinitatea tinctorială, diagnosticul poate fi orientat către diferite genuri şi/sau specii:

- cocobacili Gram negativi: *Prevotella, Prophyromonas, Haemophylus*;
- bacili Gram negativi fini efilaţi: *Fusobacterium, Capnocytophaga;*
- bacili foarte lungi, Gram negativi, cu un capăt filiform, iar celălalt pătrat: *Leptotrichia*;
- coci de dimensiuni mici, Gram negativi: *Veillonella*;
- bacili Gram pozitivi, sporulaţi: *Clostridium*;
- bacili Gram pozitivi, nesporulaţi: *Actinomyces, Propionibacterium, Bifidobacterium, Eubacterium.*

Izolarea necesită medii gelozate, cu numeroşi factori de creştere şi selectivitate ridicată, datorată adaosului de antibiotice. Însămânţarea produsului patologic se realizează pe:

- *mediu Schaedler* cu sânge, vancomicină (7,5 mg/l) şi neomicină (75mg/l). Acest mediu permite izolarea *Bacteroides* grup *fragilis*, *Prevotella, Fusobacterium;*
- geloză Columbia cu sânge şi feniletilalcool (4,2g/100ml), specific pentru bacteriile Gram pozitive şi *Porphyromonas;*
- pentru *Clostridium:* TSN, geloză cu gălbenuş de ou şi neomicină, respectiv Columbia cu sânge, cicloserină şi cefoxitin pentru *C. difficile;*
- totdeauna trebuie asociat un mediu lichid pentru anaerobi, repicat după 48-72 de ore pe geloză selectivă.

Toate mediile pentru anaerobi trebuie regenerate (pentru eliminarea O_2) înainte de utilizare pe baie Marie, la 100° C, timp de 20 minute.

Gelozia repartizată în coloană înaltă se incubează în aerobioză.

Jarurile de anaerobioză se deschid la cel puţin 24 de ore de incubare, iar în unele cazuri la 48 de ore.

De obicei, pe mediile de anaerobi apar colonii cu caractere diferite, care uneori reprezintă forme disociate ale aceleiaşi specii. Coloniile au miros fetid, adesea sunt pigmentate şi sunt diferite şi în general mult mai mari decât cele crescute pe mediile incubate în aerobioză.

Se face examenul microscopic pentru fiecare morfotip în parte.

Morfotipurile se însămânţează pe medii lichide îmbogăţite cu vitamina K1 şi hemină de pe care se realizează testul indolului, catalazei, ureazei şi aerotoleranţei (creştere în atmosferă de CO_2 5%).

Dacă la examenul microscopic se observă bacili, se realizează o serie de teste enzimatice: pentru producerea de hemolizine, fosfolipaze (lecitinază), lipaze, proteaze, fermentarea glucidelor, hidroliza esculinei, seroneutralizare şi toxinotipie şi stabilirea tipului fermentativ, după incubare timp de 48 de ore în mediu TGY, urmată de extracţia alcoolilor şi acizilor volatili cu eter etilic şi analiza cromatografică şi respectiv, prin esterificarea şi extracţia compuşilor nevolatili.

Din fiecare morfotip se realizează o pre-identificare printr-o mini-antibiogramă: vancomicină, colistin, metronidazol, verde briliant, săruri biliare, SPS (sodiu polietanol sulfat) (tabelul 62).

Tabelul 62.

Miniantibiograma folosită în diferenţierea genurilor de bacterii anaerobe.

	Vancomicină 5 µg	Kanamicină 10 µg	Colistin 10 µg	Rezistenţă la bilă bovină 2 %	SPS	Metronidazol 4 µg
Grup B. fragilis	R	R	R	+		S
Prevotella sp.	R	R	V	-		S
Porphyromonas sp.	S	R	R	-		S
B. meolitycum sp.	R	S	S	-		S
Fusobacterium sp.	R	S	S	V		S
Weillonella sp.	R	S	S	-		S
Pepstostreptococcus anaerobius	S	R	R	V	S	S
Pepstostreptococcus sp.	S	S	R	V	R	S
Clostridium sp.	S	S	R	V		S
Eubacterium sp.	S	S	R	+		S
Actinobacterium sp.	S	S	R	-		R
Bifidobacterium sp.	S	S	R	+		R
Propionibacterium sp.	S	S	R	V		R

Diferenţierea anaerobilor facultativi aparţinând clasei *Actinobacteria* (*Actinomyces, Actinobacterium, Arcanobacterium, Bifidobacterium, Propionibacterium, Eubacterium*) se realizează cu ajutorul testelor API pentru anaerobi.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Sensibilitatea la antibiotice

Bacterioides grup fragilis sunt rezistente la numeroase antibiotice. Unele specii sunt secretoare de β-lactamaze, altele sunt rezistente la metronidazol. Antibioticele recomandate a fi testate pentru diferite specii sunt prezentate în tabelul 63.

Tabelul 63.

Antibiotice testate pentru bacterii anaerobi

Bacterioides grup fragililis	Amoxicilină, amoxicilină+acid clavulanic, cefoxitin, cefotaxim, imipenem, clindamicină, metronidazol.
Alți bacili Gram negativi (*Prevotella, Fusobacterium)*	Amoxicilină, amoxicilină+acid clavulanic, metronidazol.
Coci Gram pozitivi și bacili Gram pozitivi nesporulați (*Propionibacterium, Actinomyces*)	Penicilină, metronidazol, vancomicină, ofloxacin (pentru *Propionibacterium*)
Clostridium sp.	Ampicilina, amoxicilina+acid clavulanic, metronidazol, vancomicină, clindamicină.

15.17. Diagnosticul infecțiilor cu micobacterii

În ultimele decenii, pandemia globală HIV, îmbătrânirea populației, degradarea condițiilor socio-economice, au determinat creșterea incidenței tuberculozei. Imunodepresia datorată SIDA a favorizat apariția infecțiilor cu *M. avium*, dar și cu multe alte micobacterii non-tuberculoase, cunoscute sau descoperite cu ocazia infecțiilor sistemice apărute la pacienții imunodeprimați. Deși tratamentul împotriva tuberculozei și-a dovedit eficacitatea, apariția tulpinilor multirezistente și dezvoltarea infecțiilor sistemice provocate de micobacteriile non-tuberculoase, necesită descoperirea unor antibiotice. Risc crescut de îmbolnăvire prezintă persoanele vârstnice, pacienții imunodeprimați, persoanele malnutrite, imigranții din țări cu endemie tuberculoasă, deținuții, personalul medical în contact cu pacienții TBC.

Speciile de micobacterii cel mai frecvent întâlnite în diferite tipuri de infecții sunt:

- infecții pulmonare: *M. avium – intracellulare, M. kansasii, M. xenopi, M. malmoense;*
- infecții ganglionare: *M. avium – intracellulare, M. kansasii, M. scrofulaceum;*
- infecții cutanate*: M. marinum, M. ulcerans, M. chelonaey, M. leprae;*
- supurații și ulcerație*: M. avium-intracellulare, M. kansasii, M. xenopi, M. abcessus, M. chelonaey;*
- infecții sistemice: *M. avium – intracellulare, M. kansasii, M. xenopi, M. haemophilum, M. gevanense.*

Recoltarea produselor patologice

Sputa

Reprezintă 80–85% din numărul probelor analizate pentru infecție cu micobacterii. Sputa se recoltează dimineața (2–5 ml), după clătirea cavității bucale și un efort de tuse pentru eliminarea secrețiilor acumulate în timpul nopții. Produsul recoltat este trimis rapid la laborator și conservat la +4°C. Păstrarea la frigider 24 sau 48 ore nu influențează calitatea rezultatului final. Pacienții care nu pot să expectoreze vor fi ajutați de un maseur kinetoterapeut sau se va recurge la tubaj gastric, care permite prelevarea directă din stomac a secrețiilor bronșice înghițite involuntar în timpul somnului.

Lichidul gastric aspirat dimineața, pe nemâncate, este centrifugat la 3000 rpm, timp de 20 minute. Sedimentul obținut (2 ml) va fi tratat pentru decontaminare.

La **pacienții intubați** (din reanimare) se recoltează secrețiile traheale prin introducerea unei sonde de aspirație, produsele fiind manipulate și tratate ca și sputa.

Fibroscopia permite recoltarea produselor direct din zona cu leziuni sub forma de:

- **aspirat bronșic** diluat în apă distilată sterilă, tratat ulterior ca și sputa;
- **raclaj endobronșic** obținut cu ajutorul unei mici perii care va fi plasată în lichidul de transport (1 ml), tratat ca și sputa;
- **lichid de lavaj bronho-alveolar** (obținut prin inundarea segmentului pulmonar cu 200 ml AFS și reaspirarea lichidului); după centrifugare, sedimentul (2 ml) este tratat ca o spută.

Urina se recoltează pe parcursul unei zile, după restricție hidrică în seara precedentă, este centrifugată la 1600–2000 g (30000 rpm), iar sedimentul va fi decontaminat.

RCU "SUCEAVA" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

LCR

Sedimentul rezultat după o centrifugare de 20 minute, 1600 g, este etalat pe lamă pentru colorare.

Lichidele pleurale, de ascită şi articulare, puroiul de abces sunt utilizate direct (dacă lichidul este tulbure, purulent) sau după centrifugare (lichid clar, limpede) pentru colorare şi însămânţare pe medii adecvate. Însămânţarea constă în inocularea tuburilor cu mediu cu ou, fără alte tratamente, la o diluţie a produsului 5/6 părţi ADS.

La pacienţii imunodeprimaţi cu infecţii generalizate, micobacteriile pot fi evidenţiate în *hemoculturi, mieloculturi, materii fecale.*

Biopsia de endometru permite izolarea micobacteriilor care produc tuberculoza genitală la femei.

Fragmentele de organe recoltate steril de către chirurg sunt mojarate, omogenizate şi folosite pentru însămânţarea mediilor speciale.

Probele se recoltează înainte de începerea tratamentului sau după minimum 3 zile de la încetarea acestuia.

Deoarece emisiile bacilare sunt discontinue, trebuie realizate 3 recoltări în 3 zile succesive.

Pentru izolarea micobacteriilor nu se folosesc produsele fixate cu formol.

Examenul microscopic

Se realizează pe frotiuri din produsul patologic sau din sedimentul de centrifugare obţinut după fluidificarea-decontaminarea produsului patologic contaminat. Se utilizează colorația Ziehl-Neelsen şi colorația cu auramină. În tehnica Ziehl-Neelsen, bacilii acido-alcoolo rezistenţi (BAAR) apar roşii pe fond albastru. Citirea se face la obiectivul cu imersie (x 100).

Frotiul colorat cu auramină este examinat la microscopul de fluorescenţă (x 25. B.A.A.R apar fluorescenţi, strălucind pe fondul negru al preparatului).

Citirea frotiului este cantitativă:

Număr de BAAR	Răspuns
<1 bacil/100 câmpuri	Negativ
1–9 bacili/100 câmpuri	+ suspect – se repetă
10–99 bacili/ 100 câmpuri	++
1–9 bacili/ câmp	+++
10–99 bacili/ câmp	++++
> 100 bacili/ câmp	+++++

Însămânţarea produselor patologice

Obţinerea unei culturi este foarte importantă pentru diagnosticul bacteriologic, pentru că teoretic, toţi bacilii vii dau naştere unei descendenţe.

Prelevatele care sunt în mod normal sterile (LCR, lichid pleural, pericardic, auricular, măduva osoasă, sânge) sunt inoculate direct pe mediu de cultură fără un alt tratament prealabil, în timp ce produsele contaminate sunt supuse decontaminării (tratamentul cu baze, acizi, detergenţi, permite eliminarea microbiotei comensale cu conservarea micobacteriilor, iar fluidificarea probei prin lichefiere permite eliberarea micobacteriilor).

Mediile de cultură

Mediul Lövenstein-Jensen, cu ou, este mediul de referinţă recomandat de UICTMR (Uniunea Internaţională Contra Tuberculozei şi a Maladiilor Respiratorii). Dacă este îmbogăţit cu piruvat, permite o creştere mai bună a micobacteriilor disgonice (*M. bovis*).

Mediul gelozat Middlebrook 7H10-7H11 este utilizat pentru antibiogramă.

Mediile lichide Middlebrook 7H9-7H12-7H13, Dubos şi Kirchner, sunt medii de îmbogăţire, ce conţin antibiotice (polimixină, amfotericină, acid nalidixic, trimetoprim, azlocilin, vancomicină).

Mediile 7H12 şi 7H13 utilizate în metoda Bactec 460 conţin acid palmitic marcat cu carbon 14. Metabolizarea acidului palmitic de către micobacterii este corelată cu apariţia $^{14}CO_2$ dozat printr-o cifră care reprezintă Indicele de Creştere (IC).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

O serie de metode moleculare (*hibridizarea in situ, PCR*) sunt utilizate în prezent pentru diagnosticul infecţiilor cu micobacterii, în special *M. tuberculosis*.

Identificarea micobacteriilor

Prima etapă a identificării constă în verificarea caracterului de acido-alcoolo-rezistenţă a bacteriilor prin coloraţia Ziehl-Neelsen.

Se notează de asemenea, timpul de apariţie al coloniilor sau detecţia unui IC suficient.

Pentru culturile obţinute pe mediul solid, se verifică existenţa unui singur tip de colonii. *M. avium* poate forma 2 tipuri de colonii.

Se examinează caracterele de colonie (dimensiune, caracterul neted sau rugos, pigmentaţie la întuneric, după expunerea la lumină sau absenţa pigmentului), care permit orientarea diagnosticului spre complexul *tuberculosis*, sau spre o specie non *tuberculosis*.

Astfel, pe culturile dezvoltate pe mediu solid, coloniile complexului *tuberculosis* sunt nepigmentate. Pentru diferenţierea speciilor complexului *tuberculosis* (*M. tuberculosis, M. bovis, M. africanum*, BCG), se recurge la metode clasice biochimice: se pune în evidenţă producerea de acid nicotinic (testul niacinei), existenţa unei nitrat-reductaze, influenţa piruvatului asupra culturii, creşterea sau inhibiţia creşterii în prezenţa TCH, pirazinamidă, cicloserină (tabelul 64).

În mediul lichid, dacă IC atinge sau depăşeşte 300 se realizează hibridizare cu sonde specifice.

Tabelul 64.

Caractere diferenţiale între diferite specii de micobacterii tuberculoase.

Specia	Creştere în prezenţa piruvatului	TCH 2mg/l	PZA 200mg/l	CS 30mg/l	Nitrat*-reductaza	Testul niacinei
M. tuberculosis	–	R	S	S	+	+
M.africanum	+	S(v)	S	S	– (v)	(v)
M. bovis	+	S	R	S	–	–
M. bovis var. BCG	–	S	R	R	–	–

* Metoda Virtanen, TCH – hidrazida acidului tiofen 2 – carboxilic; PZA – pirazinamida; CS – cicloserina; v – variabil; R – rezistent; S – sensibil.

Micobacteriile non *tuberculosis*

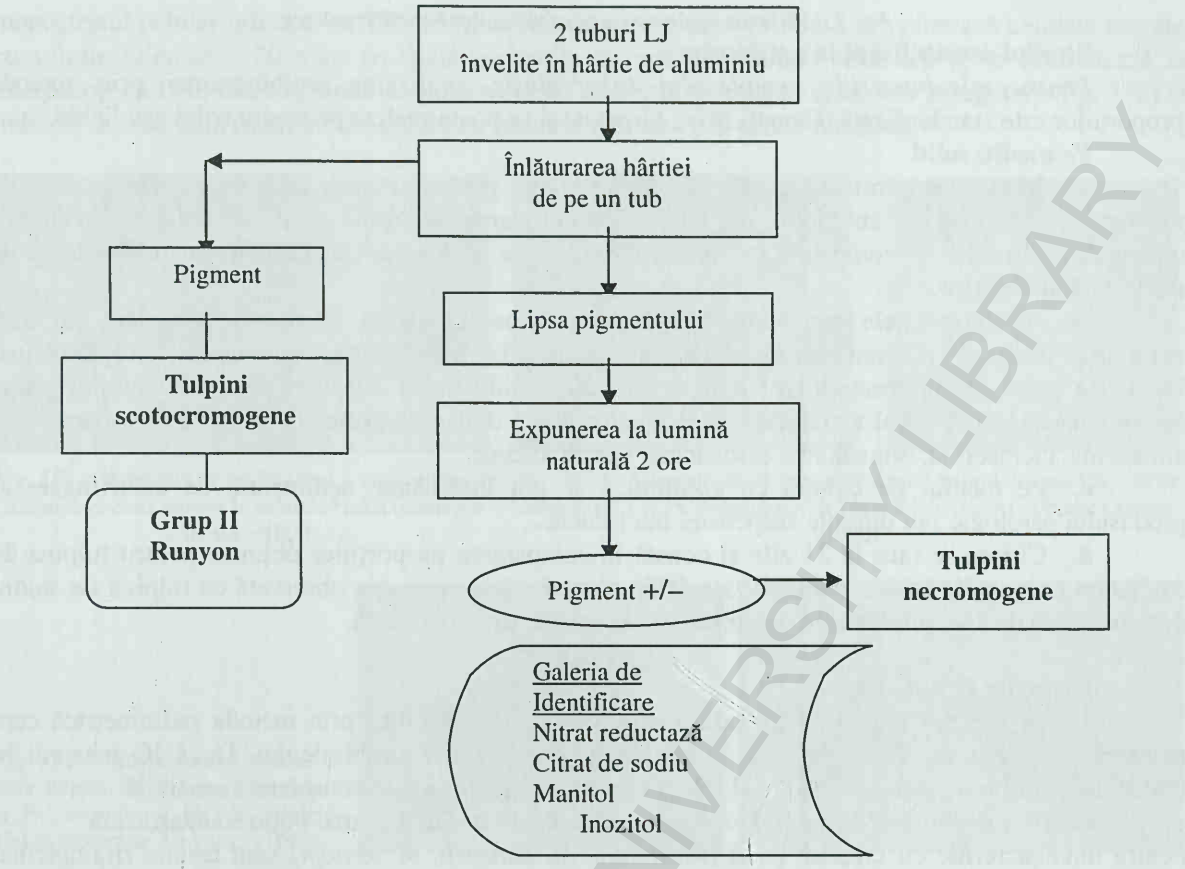
- *M. avium-intracellulare* formează colonii nepigmentate, de 2 tipuri: i) netede, transparente şi ii) opace, rugoase, formate din cocobacili acido-alcoolo-rezistenţi.
- *M. kansasii* formează colonii fotocromogene, cu creştere eugonică, rugoase, constituite din bacili groşi.
- *M. gordonae* formează colonii scotocromogene (pigmentate la întuneric), groase, netede, constituite din bacili de dimensiuni medii.
- *M. xenopi* formează colonii mici, cu creştere lentă, favorizată de piruvat, constituite din bacili lungi, filiformi.

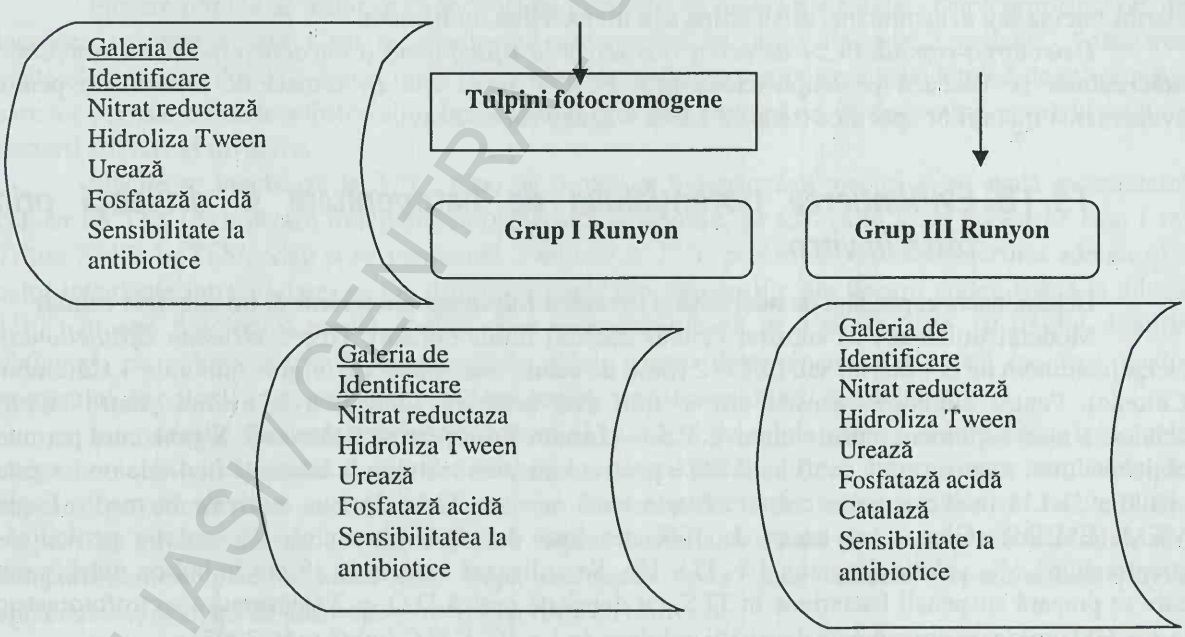
Dacă aspectul coloniilor nu este edificator, se face identificarea biochimică (fig. 351). Testele biochimice sunt realizate şi interpretate cu dificultate, necesitând tulpini de referinţă care trebuie întreţinute.

Cromatografia acizilor micolici extraşi din peretele micobacteriilor se face prin HPLC, permiţând obţinerea profilului caracteristic speciei.

Tipizarea tulpinilor se realizează prin tehnica RFLP, în care, după digestia enzimatică a moleculei de ADN cromosomal sunt obţinute fragmente al căror număr şi dimensiune variază în funcţie de tulpina analizată şi de enzima utilizată. Fragmentele obţinute sunt separate prin electroforeză. Metoda care constă în identificarea numărului de secvenţe IS 6110, ce variază în funcţie de tulpină, permite, după migrarea electroforetică şi transferul pe o membrană de nylon, realizarea unei hibridizări cu o sondă specifică.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY





Grup IV Runyon corespunde micobacteriilor cu creştere rapidă (colonii care apar în mai puţin de 7 zile)

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 351. Schema de tipizare a micobacteriilor non-tuberculoase.

Studiul sensibilității la antibiotice

Pentru micobacteriile complexului ***tuberculosis,*** realizarea antibiogramei prin metoda proporțiilor este standardizată (Canetti, Rist, Grosset) și se poate realiza pe mediu solid sau lichid.

Pe mediu solid

a. Metoda proporțiilor constă în determinarea pentru tulpina de studiat a proporției de mutante rezistente la un antibiotic, obținute după cultivarea pe medii solide ce conțin concentrații critice de antibiotice și comparate cu numărul bacteriilor viabile din același inocul însămânțate pe medii fără antibiotice.

b. Antibiogramele sunt realizate în mediu cu ou impregnat înainte de coagulare cu patru antibiotice de bază (tuberculostaticele majore): izoniazida, rifampicina, etambutolul, streptomicina. Dacă este vorba de micobacterii izolate în timpul unei recidive, sau de tulpini rezistente, antibiograma se completează cu studiul activității antibioticelor din a doua categorie (de rezervă): pirazinamida, amikacina, cicloserina, etionamida, ofloxacina, sparfloxacina.

c. Pe mediul de cultură cu antibiotice se pot însămânța: sedimentul de centrifugare al produsului patologic sau diluțiile suspensiei microbiene.

d. Citirea se face la 21 zile și constă în compararea proporțiilor obținute pentru tulpina de studiat cu proporțiile critice standardizate (1%). Astfel, când proporția observată cu tulpina de studiu este mai mică de 1%, tulpina este sensibilă, în caz invers, este rezistentă.

În mediu lichid

a. Se utilizează aceeași metodă a proporțiilor, dar stabilite prin metoda radiometrică care măsoară cantitatea de $^{14}CO_2$ produsă în prezența și în absența antibioticului. Dacă IC măsurat în flaconul cu antibiotic este 1% din cel al flaconului martor, tulpina este considerată sensibilă.

Pentru micobacteriile non tuberculoase, metoda de studiu este mai puțin standardizată.

Pentru micobacteriile cu creștere lentă (*M. avium, M. kansasii, M. xenopi)* sunt testate rifampicina, rifabutina, claritromicina sau azitromicina, ofloxacina / sparfloxacina, amikacina, iar pentru cele cu creștere rapidă (*M. fortuitum, M. marinum, M. chelonae, M. abcessus*): rifampicina, rifabutina, claritromicina sau azitromicina, doxiciclina sau minociclina, imipenem.

Detectarea rapidă, în 24 de ore a rezistenței la rifampicină a micobacteriilor din complexul ***tuberculosis*** se bazează pe amplificarea prin PCR a genei *rpo B*, urmată de hibridizare pentru evidențierea mutațiilor specifice (tehnica LIPA – Line Probe Assay).

15.18. Evidențierea potențialului de patogenitate și virulență prin teste in vitro

Determinarea capacității **de aderență și invazie a tulpinilor bacteriene la un substrat celular**

Modelul utilizează ca substrat celular sensibil liniile celulare HEp-2 (*Human Epithelioma*), HeLa (carcinom de col uterin) sau CaCo-2 (linie de celule intestinale, de origine tumorală – **C**arcinom **Co**lonic). Pentru cultivarea acestei ultime linii este necesară adăugarea la mediul pentru culturi celulare a unui supliment nutritiv numit **I.T.S. –** *(Insulin Transferrine Selenium)- Sigma,* care permite obținerea unui monostrat cu confluență 80% pentru realizarea testului de aderență în 48 de ore, aceste celule având în mod normal o creștere foarte lentă *in vitro*. Celulele sunt cultivate în mediu Eagle MEM (EMEM) (Gibco), cu adaos de 10% ser fetal de vițel, glutamină 1%, soluție penicilină-streptomicină 1%, soluție fungizon 1%, ITS 1%. Se utilizează culturi de 18 ore în bulion nutritiv din care se prepară suspensii bacteriene în TFS, cu densitate optică D.O. = 2 (măsurată spectrofotometric la λ = 600 nm), care corespunde densității celulare de 1 x 10^9 U.F.C./ml (Lazăr, 2003).

Determinarea calitativă a capacității de aderență

Se adaugă câte 1 ml de suspensie bacteriană peste monostratul celular, după îndepărtarea mediului de creștere suplimentat cu antibiotice și spălarea (de 3 ori) cu mediu fără antibiotice.

După repartizarea suspensiilor bacteriene peste monostratul celular, plăcile se incubează la 37°C, pentru 2 ore, timp în care bacteriile aderă la suprafața celulelor substratului; se spală

monostratul celular infectat, cu TFS (3x); se fixează cu metanol (5 min.); se colorează celulele aderate cu soluție Giemsa – 20 min; se spală godeurile cu apă de robinet; se usucă și se examinează la microscop cu O.I., determinându-se *pattern*-ul de aderență (localizat, difuz sau agregativ) (fig. 352) și indicele de aderență (numărul de celule cu bacterii aderate /100 celule numărate).

Fig. 352 a. Aderența de tip localizat a unei tulpini de *Staphylococcus aureus* la celulele HeLa (colorație Giemsa, x1000).

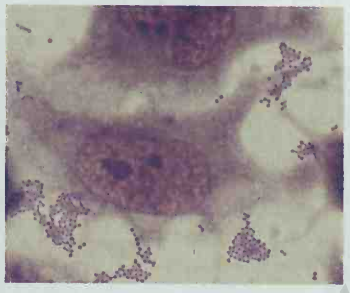


Fig. 352 b. Aderența de tip agregativ a unei tulpini de *Staphylococcus aureus* (stg.) și *Ps. aeruginosa* (dr.) la celulele HeLa (colorație Giemsa, x1000).

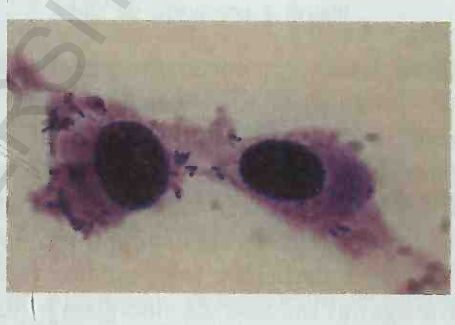


Fig. 352 c. Aderența de tip difuz a unei tulpini de *Str.pyogenes* (stg.) și *Ps. aeruginosa* (dr.) la celulele HeLa (colorație Giemsa, x1000).

Determinarea cantitativă a capacității de aderență și invazie

Fiecare tulpină de testat se va inocula în 2 godeuri cu monostrat celular. După primele 2 ore de incubare se adaugă câte 1 ml de mediu cu gentamicină într-unul din cele 2 godeuri. Adăugarea gentamicinei are rolul de a omorî toate bacteriile din mediul extracelular, supraviețuind doar bacteriile care au invadat celulele substratului. În godeurile fără gentamicină se va determina numărul total de bacterii aderate și invazive.

Plăcile se incubează la 37°C, timp de o oră; se îndepărtează mediul și se spală monostratul celular cu TFS (3x), pentru îndepărtarea bacteriilor neaderate; se adaugă în toate godeurile câte 1 ml Triton X-1% în TFS/godeu și se incubează 5 minute la 37°C pentru eliberarea bacteriilor aderate și a celor invadante intracelulare; se fac diluții zecimale din suspensiile din fiecare godeu (până la diluția $1/10^8$) în apă fiziologică sterilă (AFS), care se însămânțează în triplicat (câte 10 µl din diluțiile obținute), pe geloză nutritivă repartizată în plăci, pentru determinarea U.F.C./ml (se face media numărului de colonii crescute pentru cele trei replici ale fiecărei diluții însămânțate).

În godeurile fără gentamicină se determină numărul de celule aderate și invadante, iar în cele cu gentamicină se determină numărul de celule invadante (internalizate). Interpretarea rezultatelor se bazează pe compararea ordinelor de mărime ale numărului de celule viabile (U.F.C./ml) din suspensiile utilizate ca inocul pentru fiecare tulpină bacteriană testată și din suspensiile celulare din compartimentele plăcilor *multi-well,* după realizarea celor două modele experimentale pentru aprecierea capacității de aderență + invazie și respectiv, invazie.

Determinarea capacității de aderență la substratul inert – testul producerii de *slime* (peliculă)

Factorul slime (exopolizaharid hidrofil secretat de unele tulpini care mediază aderența celulelor bacteriene la suprafețe inerte, abiotice) este un indicator al gradului de rezistență și al capacității de supraviețuire a tulpinilor bacteriene în mediul extern și poate constitui un factor de virulență, în cazul infecției unui organism gazdă, prin blocarea procesului de fagocitoză. Tulpinile bacteriene sunt cultivate pe geloză cu sânge de berbec, incubată timp de 24 h la 37°C. Pentru fiecare

tulpină se obțin din câte o colonie, două suspensii bacteriene identice în apă peptonată (repartizată câte 1 ml în tuburi de diametru de 12 mm), incubate timp de 24 h la 37°C. După incubare, tuburile sunt golite de cultura bacteriană, spălate de 3 ori cu apă de robinet, uscate la temperatura camerei, colorate cu soluție alcoolică de safranină 1% – 30 min, spălate de 2 ori cu apă de robinet și uscate. Prezența inelului roșu pe pereții interiori ai tuburilor se înregistrează ca rezultat pozitiv, iar absența inelului roșu ca rezultat negativ (fig. 353).

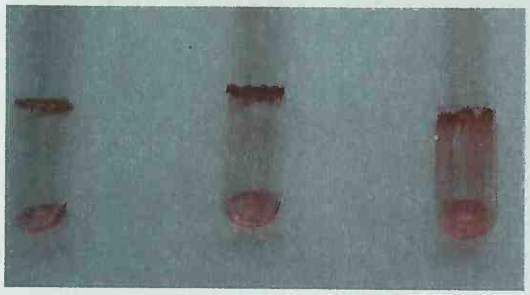


Fig. 353. Evidențierea semicantitativă a producerii de *slime*.

Evidențierea cantitativă a gradului de aderență la substratul inert se poate realiza prin metoda microtitrării. În acest scop, suspensiile microbiene de densitate cunoscută se însămânțează în mediu lichid repartizat în plăci cu 6/12/24/96 de godeuri, se incubează la 24 h la 37°C. După incubare plăcile sunt golite de cultura bacteriană, spălate de 3 ori cu apă de robinet, fixate cu metanol rece timp de 5 min, colorate cu cristal violet 1% – 15 min, spălate cu apă de robinet, resuspendate cu acid acetic 33%. Intensitatea culorii suspensiei colorate, direct proporțională cu capacitatea de aderență la substratul inert, se măsoară spectrofotometric (A490 nm) (fig. 354).

Evidențierea hemolizinelor. Hemolizinele sunt enzime extracelulare care acționează în patogeneza diferitelor specii bacteriene ca toxine formatoare de pori. Bacteriile produc mai multe tipuri de hemolizine, evidențiate prin diferite teste: liza hematiilor de berbec (evidențierea factorul hemolitic Kanagawa) sau teste de sinergism pentru evidențierea hemolizinelor incomplete, solubile, termostabile, de tip factori CAMP-*like* (Christie, Atkins, Munch-Petersen, 1944, Munch-Petersen și Christie, 1947), care produc liza hematiilor doar în prezența unei sfingomielinaze C (toxina ß) produsă de o tulpină de *S. aureus*. Dintre hemolizine, cea de tip Kanagawa are rol de enterotoxină, a cărei acțiune toxică a fost demonstrată în teste de patogeneză experimentală (determină acumularea lichidului în ansa ligaturată de iepure, ceea ce demonstrează inducerea formării porilor în enterocite și alterarea *pattern*-ului secretor al acestor celule).

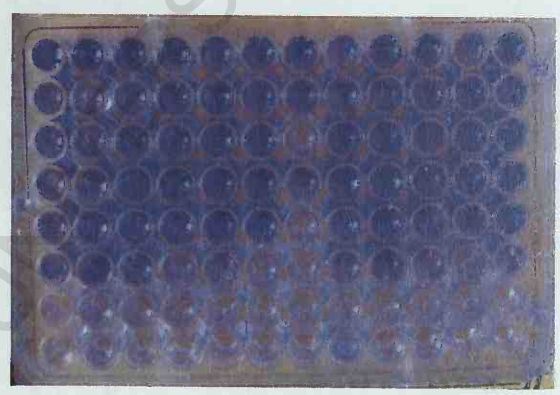


Fig. 354. Evidențierea cantitativă a producerii de *slime* prin metoda microtitrării.

Detectarea producerii de hemolizine se evidențiază prin însămânțarea bacteriei pe geloză repartizată în plăci Petri cu adaus de 5% sânge de berbec sau sânge de iepure (evidențierea hemolizinelor Kanagawa). După incubare la 37°C timp de 24 h se vizualizează apariția zonelor de hemoliză în jurul coloniilor, sub forma unui halou transparent, clar, caracteristic pentru tulpinile β-hemolitice, o hemoliză completă, în care hemoglobina eliberată din hematii sub acțiunea β-hemolizinelor este degradată total până la produși finali de metabolism) sau un halou verzui/roz, caracteristic tulpinilor α-hemolitice care produc o hemoliză parțială, cu degradarea parțială a hemoglobinei, la methemoglobină). Zona de hemoliză poate fi accentuată prin păstrarea plăcilor la frigider câteva ore înainte de citirea rezultatelor (fig. 355).

BCU IAȘI CENTRU UNIVERSITAR

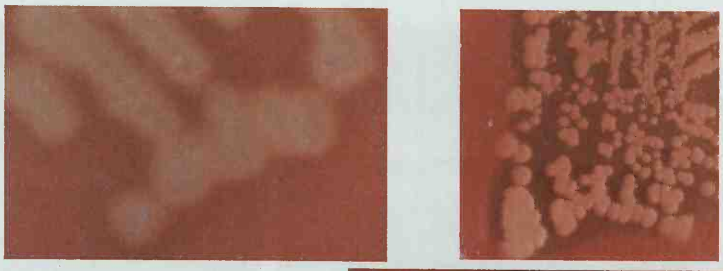


Fig. 355 a. Colonii ß-hemolitice de *Str. pyogenes* (stg.) şi *S. aureus* (dr.).

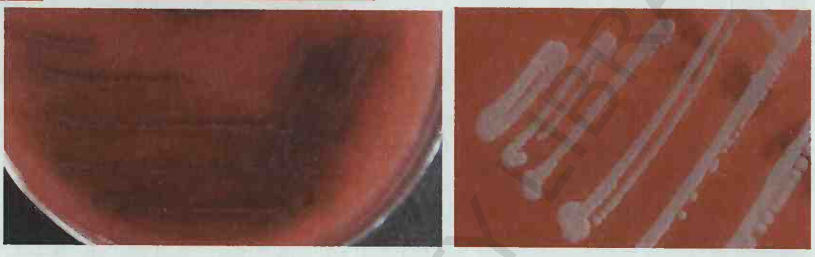


Fig. 355 b. Cultură d-hemolitică de *Str. pneumoniae* (stg.) şi nehemolitică de *S. epidermidis* (dr.).

Testul de evidenţiere a factorului CAMP şi a factorilor CAMP-like

Unele bacterii posedă hemolizine incomplete, care pot induce formarea porilor în membrana eritrocitelor doar în prezenţa unei enzime solubile denumite *sfingomielinaza C*, secretată de tulpini de *S. aureus* β-hemolitice. Pentru detectarea acestor factori CAMP sau CAMP-*like,* tulpinile se însămânţează în striuri paralele pe geloză-sânge, iar perpendicular pe aceste striuri, la 2 mm distanţă, se însămânţează o tulpină de *S. aureus* β-hemolitică ATCC 25923. Prezenţa factorului CAMP este indicată de apariţia unei zone sinergice de hemoliză completă la extremitatea striurilor din vecinătatea tulpinii de *S. aureus* β-hemolitică, cu aspect de "săgeată", în timp ce pe restul lungimii striului de cultură hemoliza este incompletă sau chiar absentă (Pasteur Inst., 2000). Testul CAMP este utilizat pentru identificarea tulpinilor de *Str. agalactiae* şi *Listeria monocytogenes,* producătoare de factori CAMP (Murphy, 1952; Groves şi Welshimer, 1976; Wilkinson, 1977). Tulpinile de *Str. agalactiae* pot fi utilizate pentru confirmarea tulpinilor de *Clostridium perfringens* în testul numit CAMP inversat, în care factorul CAMP produs de streptococul de grup B permite evidenţierea sfingomielinazei produse de *Clostridium* (Gubash, 1978; Hansen şi Elliot, 1980; Buchanan, 1982) (fig. 356).

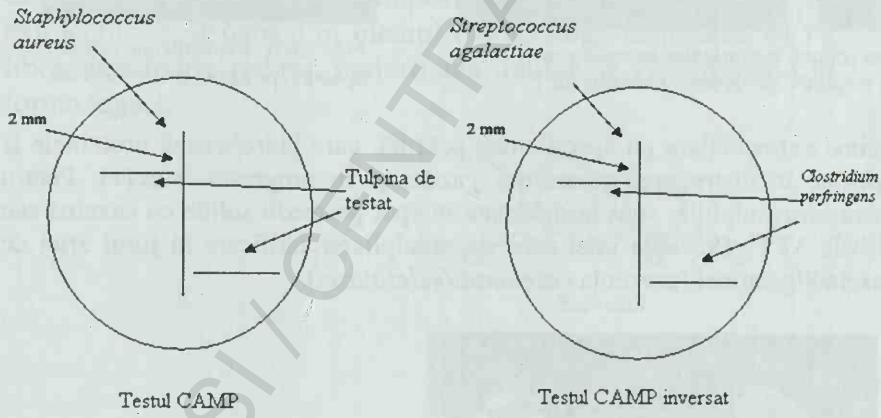


Fig. 356a. Reprezentarea schematică a tehnicii testului CAMP.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

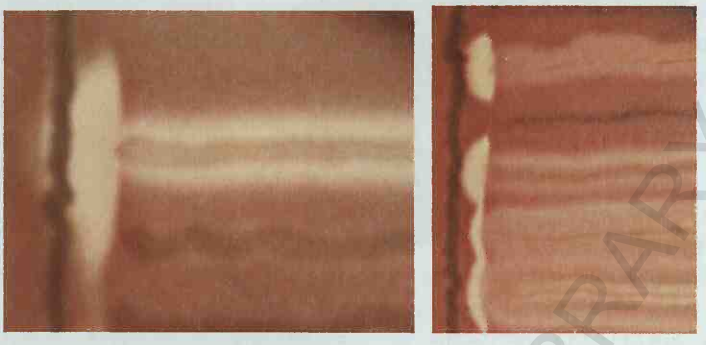


Fig. 356b. Evidenţierea factorului CAMP la tulpini de *Str.agalactiae* şi *V. cholerae.*

Lecitinazele şi *lipazele* sunt enzime implicate în patogeneza unor tulpini bacteriene prin capacitatea lor de a induce formarea porilor în membrana celulelor eucariote, prin alterarea conţinutului lipidic al acesteia. Astfel, în cursul infecţiei aceste enzime pot acţiona ca toxine formatoare de pori, factori de virulenţă ce determină diareea apoasă caracteristică infecţiei holerice. Pentru evidenţierea *producerii de lecitinază*, tulpinile sunt însămânţate în spot pe mediu solid cu gălbenuş de ou şi incubate la 37°C până la 7 zile. Prezenţa unei zone transparente în jurul ariei de creştere indică producerea lecitinazei (fig. 357a). Pentru evidenţierea *producerii lipazei*, tulpinile sunt însămânţate în spot pe mediu solid cu adaos de Tween 80 în concentraţie finală de 1% şi incubate la 37°C până la 7 zile. Prezenţa unei zone opace (de precipitare) in jurul ariei de creştere indică producerea de lipază (fig. 357b).

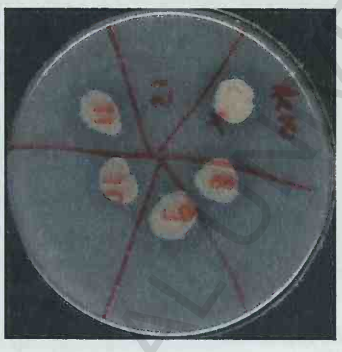


Fig. 357a. Evidenţierea acţiunii lecitinazelor pe mediu cu gălbenuş de ou (stg.) şi respectiv, pe mediu cu lecitină (dr.).

Fig. 357b. Evidenţierea acţiunii lipazelor, pe mediu cu TWEEN-80.

Proteazele sunt enzime extracelulare cu specificitate scăzută, care hidrolizează proteinele la peptide şi aminoacizi, implicate în distrugerea ţesuturilor gazdei şi în progresia infecţiei. Pentru evidenţierea *producerii proteazelor*, tulpinile sunt însămânţate în spot pe medii solide cu cazeină sau cu gelatină, şi incubate 24 h la 37°C. Prezenţa unei zone de precipitare/clarificare în jurul ariei de creştere indică proteoliza cazeinei/gelatinei (prezenţa *cazeinazei/gelatinazei*).

Fig. 358. Evidenţierea acţiunii cazeinazei pe mediu cu cazeină (stg.) şi respectiv a gelatinazei pe mediu cu gelatină (dr.).

Producerea DN-azei: tulpinile sunt însămânțate în spot pe geloză cu ADN și menținute timp de 24 h la 37°C. După incubare, peste culturile în spot se adaugă câteva picături de soluție HCl 1N, clarificarea zonei în jurul ariei de creștere fiind înregistrată ca reacție pozitivă (fig. 359).

Nucleazele stafilococice sunt enzime termorezistente, elaborate de tulpinile patogene coagulazo-pozitive în proporție de 90–95%.

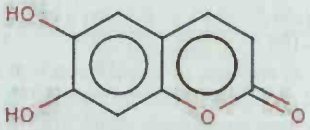
În eneral, DN-azele asigură reducerea vâscozității secrețiilor în care se acumulează ADN din celulele lizate, permițând diseminarea bacteriilor și, totodată, conferă speciilor producătoare un avantaj competitiv, furnizându-le mononucleotide pentru propriile sinteze.

Fig. 359. Evidențierea acțiunii DN-azei pe mediu cu ADN, după inundarea plăcii cu HCl.

Mucinaza joacă un rol foarte important în virulența unor tulpini bacteriene și reprezintă un complex enzimatic care scindează mucina gastrică, favorizând accesul microorganismelor la receptorii specifici de pe suprafața celulelor epiteliale. În același timp produșii de hidroliză ai mucinei „tapetează" celulele bacteriene și le protejează de acțiunea nocivă a pH acid și a altor molecule implicate în apărarea anti-infecțioasă la nivelul mucoaselor. *Pentru evidențierea producerii mucinazei* tulpinile sunt însămânțate în spot pe mediu cu mucina din stomac de porc și incubate la 35°C până la 7 zile, activitatea enzimatică fiind determinată prin prezenta unui halou transparent în jurul ariei de creștere, accentuată după inundarea plăcii cu soluție Lugol 1:2:300 (fig. 360).

Hidroliza esculinei. Esculina (un glucozid) este hidrolizată la glucoză + esculetol. În prezența citratului de Fe ($FeC_6H_5O_7$) (FeIII) din mediu, esculetolul eliberat sub acțiunea unei β-galactozidaze generează formarea unui precipitat negru de esculetină ferică, compus cu Fe, fenolic cu structură chimică incertă. S-a demonstrat că esculetolul poate fixa chelatorii de fier (de tipul transferinei), furnizând astfel ionii de Fe necesari celulelor bacteriene pentru activarea unor gene și exprimarea unor factori de virulență (în speță, toxina holerică). Rolul esculetolului este foarte important la bacteriile patogene extracelulare, deoarece în mediul extracelular, cantitățile de Fe liber sunt foarte reduse, majoritatea ionilor de Fe circulând în forma legată.

Fig. 360. Evidențierea mucinazei pe mediu cu mucină de porc.



Esculetol

Bibliografie

1. Van Dyck E., Meheus A. Z., Piot P. 1999. *Laboratory diagnosis of sexually transmitted diseases*. Geneva, World Health Organization
2. Leigh D. A., Williams J. D. 1964. Method for the detection of significant bacteriuria in large groups of patients. Journal of Clinical Pathology. 17: 498–503.
3. Kilian M., Borrow P. 1976. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. 1. Detection of bacterial glycosidases. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, Section B 84:245–251
4. O' Farell N. 2002. Donovanosis. Sex Transm Infect;78:452–457
5. Begg N. 1994. Manual for the management and control of diphtheria in the European region. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe.
6. Tenover F. C., Hirschmann J. V. 1990. Interpretation of Gram stains and other common microbiologic slide preparations.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

7. Hammond G. 1978. Public Health Image Library, CDC
8. Buiuc D., Negut M. 1999. Tratat de Microbiologie Clinica, *Ed. Medicala*, Bucureşti
9. Mihăescu Gr., Chifiriuc Carmen, Dițu Lia Mara, 2007. Microbiologie generală, *Editura Universității,* Bucureşti
10. Mihăescu Gr., Chifiriuc Carmen, Dițu Lia Mara, 2007, Antibiotice şi substanțe chimioterapeutice antimicrobiene, Editura Academiei Române
11. Mihăescu Gr., Chifiriuc Carmen, Ciugulea I., 2005, Toxine şi substanțe potențial toxice, Editura Academiei Române
12. Mihăescu Gr. Microbiologie generală şi Virologie, 2000, *Editura Universității,* Bucureşti.
13. Lazar V. 2003. Aderența microbiană, *Ed. Academiei Române*
14. Pasteur Institute. 2000. Cours de Bacteriologie Medicale. Travaux Pratiques. Milieux de culture et techniques, *Institut Pasteur Centre de l'Enseignement,*
15. Ordinul MSP 1301/2007 /MO 617/06.11.2007 privind aprobarea Normelor privind funcționarea laboratoarelor de analize medicale
16. Standardul 15189 – Laboratoare medicale. Cerințe particulare pentru calitate şi competență
17. Contract- cadru privind condițiile acordării asistenței medicale în cadrul sistemului de asigurări sociale de sănătate pentru anul 2009
18. Ordinul MSP 1301/20.07.2007; SECȚIUNEA a 9-a. Managementul calității. Controlul intern de calitate şi evaluarea externă a calității în laboratorul de analize medicale.
19. Bâlbâie V. şi Pozsgi N. 1985. Bacteriologie medicală volumul I şi II, Ed. medicală
20. Buiuc D. şi Neguț M. 2009. Tratat de microbiologie clinică, ed. A III-a, Ed. medicală
21. Murray P. M. 1998. Pocket guide to Clinical Microbiology; 2nd Ed. ASM-Press, Washington DC
22. Murray P. M. 2007. Clinical Manual of Microbiology
23. Isenberg H. D. 2004. Clinical Microbiology –Procedures Handbook; Second Edition, vol. 1–3
24. CLSI. 2010. Performance Standards for Antimicribial Susceptibility Testing; Clinical and Laboratory Standard Institute
25. MICROBIOLOGICS. Asigurarea calității microorganismelor. Păstrare • Procesare • Întreținere
26. WHO. 2003. Basic laboratory procedures in Clinical bacteriology, 2nd Ed.
27. Hopkins B. T. 2005. Laboratory Notes. Guide to Laboratory and Diagnostic tests
28. REMIC. 2008. Reférentiel en Microbiologie médicale, Société Française de Microbiologie, Collection Vivactis plus éditions
29. BE EN ISO 8402/1995. Quality management and quality assurance. Vocabulary.
30. ISO Guide 30:1992. Terms and definitions used in connection with reference materials
31. EA- 04/10. 2002. Accrediation for microbiological laboratories
32. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
33. OUG 65/2005. Ordonanta de urgenta privind modificarea si completarea Legii nr. 53/2003 – Codul muncii, oug nr. 65/2005
34. L53/2005. Proiect de Lege pentru aprobarea Ordonanței de urgență a Guvernului nr. 8/2005 privind modificarea şi completarea Legii nr.67/2004 pentru alegerea autorităților administrației publice locale
35. ISO/TS 11133-1:2009. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory
36. USP – US Pharmacopeia. Reference Standards
37. Brooks G. F., Caroll K. C., Butel J. S., Morse S. A. eds. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition http:// www.accessmedicine.com
38. Buchanan A. G. 1982. Clinical laboratory evaluation of a reverse CAMP test for presumptive identification of *Clostridium perfringens*. J. Clin. Microbiol. 14:761–762.
39. Christie N. E., Atkins N. E., Munch-Petersen E. 1944. A note on a lytic phenomenon shown by group B *Streptococcus*. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 22:193–195.
40. Darling, J. F. 1975. Standardization and evaluation of CAMP reaction for the prompt, presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) in clinical material. J. Clin. Microbiol. 1:171–174.
41. Groves R. D., Welshimer H. J. 1977. Separation of pathogenic from apathogenic *Listeria monocytogenes* by three in vitro reactions. J. Clin. Microbiol. 5:559–563.
42. Gubash S. 1978. Synergistic hemolysis phenomenon shown by an alpha-toxin producing *Clostridium perfringens* and streptococcal CAMP factor in presumptive streptococcal grouping. J. Clin. Microbiol. 6:480–488.
43. Hansen M. V., Elliott L. F. 1980. New presumptive test for *Clostridium perfringens*: reverse CAMP test. J. Clin. Microbiol. 12:617–619.
44. Munch-Petersen E., Christie R. 1947. The effect of the interaction of Staphylococcus b toxin and group B streptococcus substance on red blood corpuscles and its use as a test for the identification of *Streptococcus agalactiae*. J. Pathol. Bacteriol. 59:367–371.
45. Murphy J. M., Stuart O. M., Reed F. I.. 1952. An evaluation of the CAMP test for the identification of *Streptococcus agalactiae* in routine mastitis testing. Cornell Vet. 42:133–147.
46. Wilkinson H . W. 1977. CAMP-disk test for presumptive identification of group B streptococci. J. Clin. Microbiol. 6:42–45.

BCU CLUJ UNIVERSITY LIBRARY

16. TERAPIA ANTIMICROBIANĂ

Antibioticele sunt substanțe chimice cu greutate moleculară mică, produse de microorganisme prin procese de biosinteză, semisinteză sau prin sinteză chimică, care în concentrație mică inhibă multiplicarea sau omoară microorganismele (Mihăescu şi colab., 2008).

Datorita specificității lor de acțiune, antibioticele manifestă eficiență diferită față de diferite specii microbiene; totalitatea speciilor microbiene sensibile la un anumit antibiotic definește ***spectrul de activitate*** al antibioticului respectiv (fig. 361). În funcție de numărul şi diversitatea speciilor microbiene afectate, spectrul de activitate al antibioticelor poate fi:

- *larg* (de exemplu, spectrul de acțiune al tetraciclinei este reprezentat de bacterii Gram negative, inclusiv chlamidii şi rickettsii şi specii Gram pozitive; penicilinele sunt active în special față de specii Gram pozitive, dar şi Gram negative, inclusiv chlamidii; nitrofuranii, rifampicina, sulfamidele sunt active pe un număr mare de specii bacteriene Gram pozitive şi Gram negative şi pe bacteriile acido-alcoolo-rezistente);
- *îngust* (novobiocina este activă față de bacteriile Gram pozitive, mai ales stafilococi, dar şi pe coci şi bacili Gram negativi, cum ar fi *Haemophilus sp.* şi *Pasteurella* sp.; glicopeptidele, bacitracina, pe bacterii Gram pozitive);
- *limitat* (nitroimidazolii sunt activi faşă de microorganismele anaerobe).

Chiar în cadrul aceleiaşi specii microbiene, pot exista diferențe mari de sensibilitate a diferitelor tulpini față de un anumit antibiotic, astfel că stabilirea tratamentului cu antibiotice în clinică necesită izolarea agentului etiologic al infecției respective (mai ales dacă acesta aparține unor genuri şi specii supuse fenomenului de dobândire a rezistenței clinice) şi determinarea spectrului său de sensibilitate la antibiotice.

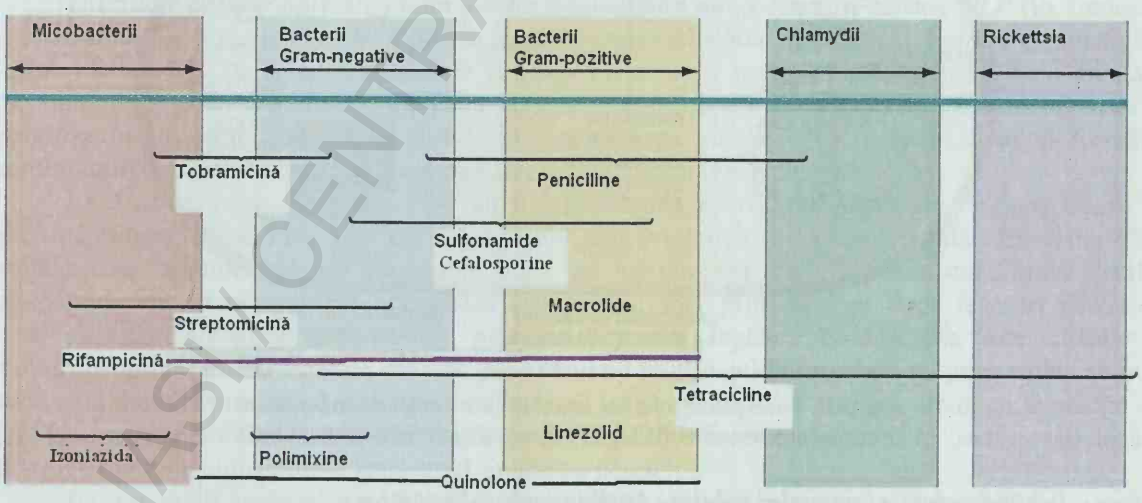


Fig. 361. Reprezentarea spectrului de activitate al principalelor clase de antibiotice (http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/micro%20resources.htm).

Activitatea antimicrobiană *in vivo* este mult mai complexă, implicând pe lângă antibiotic şi agentul microbian, şi factorul gazdă. Astfel, în organismul gazdă o serie de factori locali (presiunea parțială a O_2, pH etc.) influențează activitatea antibioticului. Datorită multiplelor mecanisme de apărare ale gazdei, microorganismele au o rată metabolică redusă, ceea ce scade eficiența

antibioticelor. Pe de altă parte, antibioticele se absorb din tractul intestinal şi se distribuie inegal în diferite ţesuturi şi umori ale organismului şi foarte puţine realizează concentraţii active în SNC sau în interiorul celulelor eucariote. De asemenea, este foarte dificil de menţinut concentraţia activă a antibioticului pe o perioadă mai lungă de timp, de aceea intervalul dintre doze trebuie respectat riguros. Unele antibiotice au efect postantibiotic (de exemplu carbapenemii faţă de bacilii Gram negativi), şi pot modula răspunsul inflamator, în sensul cronicizării reacţiei inflamatorii datorită acumulării de fragmente bacteriene. De asemenea, antibioticele pot determina apariţia unei stări de disbioză, care favorizează suprainfecţia cu tulpini microbiene rezistente (*Pseudomonas sp., Clostridium difficile, Candida albicans*). Antibioticele exercită efecte toxice asupra gazdei şi pot induce reacţii de hipersensibilitate. Adiministrarea empirică a antibioticelor, înainte de izolarea şi identificarea agentului infecţios şi de determinarea *pattern*-ului de sensibilitate la antibiotice, poate masca o infecţie gravă şi poate conduce la dezvoltarea rezistenţei la antibiotice în populaţiile microbiene. Asocierea a două sau mai multe substanţe antimicrobiene este recomandată în cazul infecţiilor foarte severe, în cazul infecţiilor cronice, pentru evitarea apariţiei mutantelor rezistente (de exemplu, *M. tuberculoris*), în infecţiile mixte, pentru obţinerea unui sinergism de acţiune şi a unui efect puternic bactericid (de exemplu, aminoglicozide şi ß-lactamice, trimetroprim şi sulfametoxazol, amfotericina şi flucitozina, inhibitorii de ß-lactamaze şi ß-lactamicele). Efectul antagonist poate apărea atunci când un antibiotic bacteriostatic este asociat cu unul bactericid.

Medicamentele antimicrobiene acţionează pe următoarele căi (fig. 362):

- inhibiţia sintezei peretelui celular;
- inhibiţia funcţiilor membranei celulare;
- inhibiţia sintezei proteinelor la diferitele trepte (traducerea şi transcrierea materialului genetic);
- inhibiţia sintezei acizilor nucleici;
- blocarea unei căi metabolice prin inhibiţie competitivă.

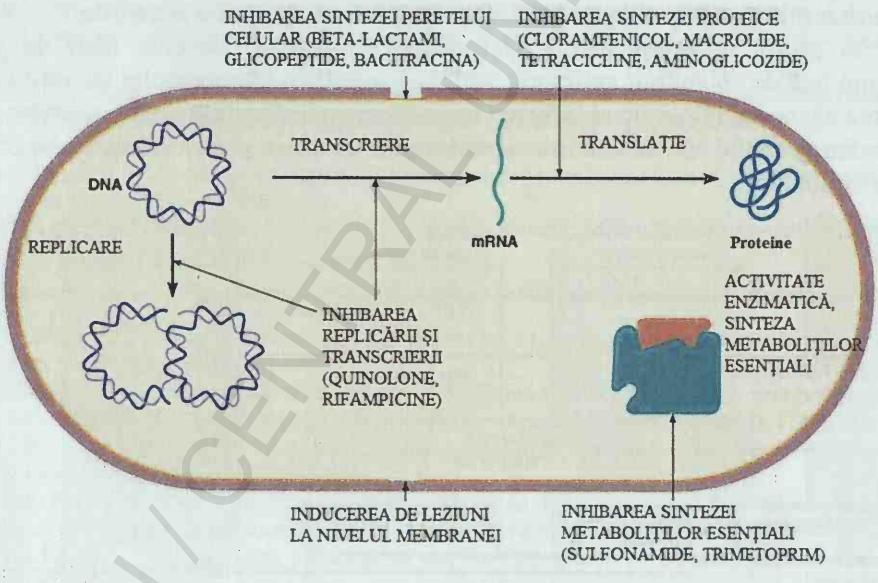


Fig. 362. Principalele ţinte ale acţiunii substanţelor antimicrobiene (http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/micro%20resources.htm).

Inhibiţia sintezei peretelui celular. Antibioticele ß-lactamice

Peretele mureinic este o cu o structură închisă, legată covalent, care permite adăugarea noilor unităţi pentru creştere. Straturile de mureină sunt adăugate secvenţial pe faţa externă a membranei citoplasmatice, în proximitatea ei, chiar sub stratul mureinic anterior. Pe măsură ce noile straturi de mureină sunt adăugate, cele vechi sunt deplasate spre exterior şi sunt supuse unor forţe de întindere tot mai mari, până la limita elasticităţii lor. În acest punct, autolizinele sunt extruzate din celulă şi hidrolizează stratul cel mai tensionat. Fragmentele mureinice sunt eliberate şi uneori chiar reutilizate.

Sinteza *mureinei* are loc în 3 stadii. *În primul stadiu*, în citoplasmă, se sintetizează precursorii solubili cu greutate moleculară mică – UDP-GlcAc şi UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu-mezoDap-D-Ala-D-Ala. Unii agenţi antibacterieni interferă cu treptele timpurii ale sintezei peretelui. Iniţial, la UDP-MurNAc este adăugat un tripeptid, la care va fi legat dipeptidul D-ala-D-ala, sintetizat de o enzimă specifică. D-ala este produsă din L-ala sub acţiunea alanin-racemazei.

Stadiul al doilea al sintezei peretelui celular este catalizat de enzime legate de membrană. Regiunea non-nucleotidică a moleculei precursoare sintetizată anterior (intermediarul N-acetil glucozamina şi acidul N-acetil muramic-pentapeptid) este ataşată la un *purtător lipidic* (undecaprenol-pirofosfat, denumit bactoprenol), generând lipidul I. Acesta este integrat în membrană şi modificat ulterior prin adăugarea GlcNac şi pentaglicinei. Se formează undecaprenol pirofosfat-MurNac (-L-Ala-D-Gln-(NH_2-(Gly_5)L-Lys-D-Ala-D-Ala)-(β1-4)-GlcNac (lipidul II) şi este translocat prin membrana plasmatică. Lipidul II are rol de substrat pentru reacţia de *transglicozilare*, polimerizând catenele glican ale peretelui celular bacterian. Rezultă astfel *dizaharidul repetitiv (MurNac-GlcNac)n*. Purtătorul lipidic are rol de punct de ataşare de membrană pentru precursori şi permite transportul subunităţilor prin interiorul hidrofob al membranei citoplasmatice, la suprafaţa celulei.

În stadiul al treilea al sintezei, subunităţile peptidoglicanice sunt polimerizate prin inserţia în peretele celular existent. Polimerizarea se face prin transferul peptidoglicanului nou, de la purtătorul său localizat în membrană, la peptidoglicanul parietal preexistent, printr-o reacţie de transpeptidare ce implică lanţurile peptidice ale ambilor polimeri, dintre care unul trebuie să posede resturi D-ala-D-ala terminale. Reacţia este catalizată de un complex de enzime secretate prin membrană. Ele sunt autolizine, transglicozilaze şi transpeptidaze, toate cu acţiune degradativă strict controlată asupra peretelui celular, permiţând creşterea şi diviziunea celulei.

Polimerizarea glucidului şi legarea încrucişată a catenelor tetrapeptidice, denumită reacţia de *transpeptidare*, este catalizată de *proteine-enzime care leagă penicilina* (*penicillin binding proteins* - PBP), localizate la nivelul membranei citoplasmatice şi în spaţiul periplasmic.

Dizaharid-pentamuropeptidul extruzat prin membrana citoplasmatică, este inserat în reţeaua mureinică în creştere. Peptidul se leagă de un alt peptid ce aparţine altui lanţ. Legarea celor două *dizaharid-pentamuropeptide* prin secvenţele terminale se face cu consum de energie furnizată de reacţia de transpeptidare şi pierderea D-ala terminală a uneia dintre cele două muropeptide. Rezultă astfel un nonamuropeptid (penta-tetrapeptid). Restul D-ala al celuilalt muropeptid este adeseori hidrolizat şi rezultă un *octa-* sau chiar un *heptamuropeptid*.

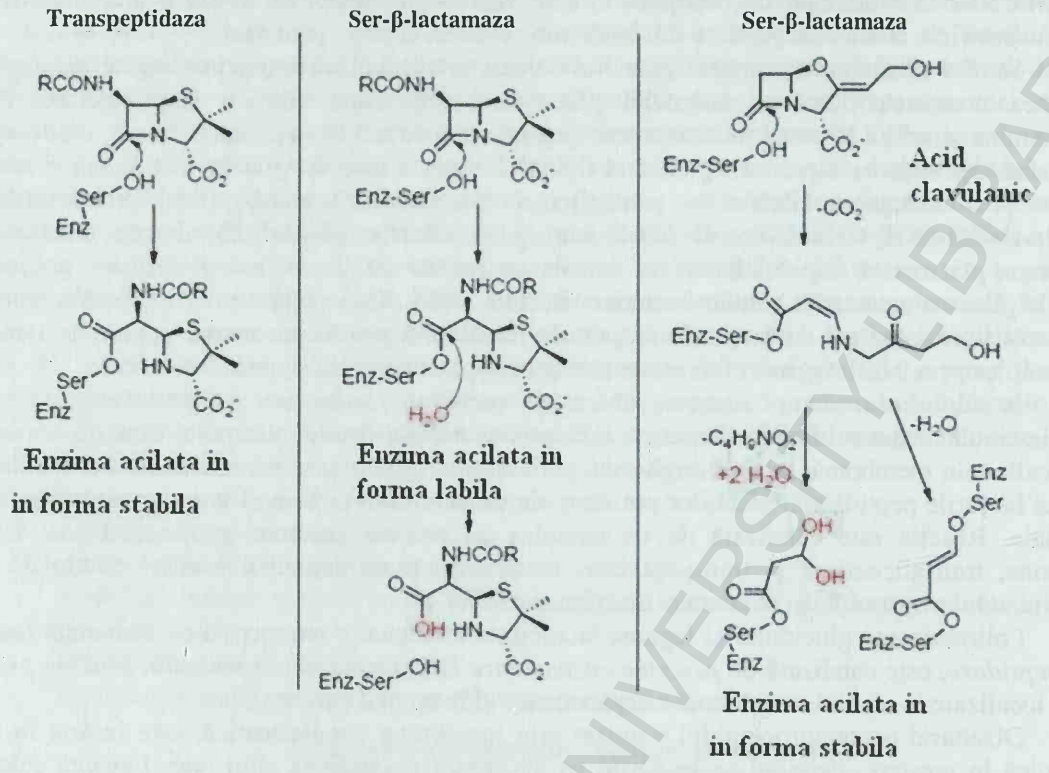
Diferitele enzime ţintă ale antibioticelor ß-lactamice sunt denumite generic *PLP* (lb. franceză – *protein liant les penicillines*) sau *PBP* (lb. engleză -*penicillin binding protein*). Funcţia enzimatică a fiecărei PBP a fost studiată în detaliu la *E. coli*. La această specie există patru PBP cu greutate moleculară mare (PBP 1a, 1b, 2 şi 3). Toate sunt enzime bifuncţionale: catalizează *transpeptidarea* şi *transglicozilarea* peptidoglicanilor. Rolul PBP ca enzime implicate în procesul final al formării peretelui mureinic a fost descoperit prin marcare cu penicilină G radioactivă.

La *Staphylococcus aureus*, PBP au funcţii fiziologice de transpeptidaze, endopeptidaze şi carboxipeptidaze. Unele PBP sunt esenţiale pentru supravieţuirea şi creşterea celulei. Existenţa PBP esenţiale este argumentată de mutantele care nu sintetizează PBP şi sunt condiţionat letale. Transpeptidazele (transamidaze) acţionează asupra mureinei prin clivarea unor legături peptidice critice şi reformarea legăturii cu alt partener peptidic: legătura D-ala-D-ala este clivată şi tetramuropeptidul rămâne legat de enzimă, până când alt muropeptid furnizează un grup amino al unui rest de acid diaminopimelic. Autolizinele (hidrolaze) leagă apa în locul grupării amino şi în reacţia de hidroliză a mureinei eliberează D-ala. Acţiunea lor împiedică formarea legăturilor transversale locale şi distruge mureina numai într-o zonă strict limitată a peretelui.

Baza acţiunii antibioticelor β-lactamice constă în aceea că substratul transpeptidării – *capătul carboxil al D-ala din structura intermediarului dizaharid-tetrapeptid* – are omologie structurală strânsă cu inelul β-lactamic (fig. 363). Antibioticele β-lactamice inhibă astfel ultima etapă a sintezei peptidoglicanilor, adică formarea *punţilor interpeptidice*.

Antibioticele ß-lactamice acţionează ca pseudosubstraturi şi *acilează* situsurile active ale *transpeptidazelor* PBP, care devin astfel incapabile să catalizeze reacţiile de polimerizare ale subunităţilor mureinice. Reacţia de acilare a PBP este foarte lent reversibilă. Enzimele PBP deacilate

devin incapabile să catalizeze reacțiile de legare încrucişată a peptidelor. Complexul antibiotic-PBP stimulează eliberarea autolizinelor, cu efect degradativ asupra peretelui celular, care are drept consecință liza osmotică a celulei bacteriene.



Antibioticele ß-lactamice sunt divizate în 4 subclase: peniciline, cefalosporine, monobatcami şi carbapenemi. Antibioticele β-lactamice inhibă ultima etapă a sintezei peptidoglicanului, adică formarea punților interpeptidice. Aceşti compuşi prezintă o analogie structurală cu dipeptidul terminal D-ala-D-ala, care face parte din pentapeptidul mureinic.

Penicilina G este antibioticul de elecție în cazul infecțiilor cu streptococi, pneumococi, meningococi, spirochete, clostridii, bacili aerobi Gram pozitivi, streptococi sensibili la penicilină, gonococi şi actinomicete, enterococi (pentru un efect bactericid, acest ultim caz necesită asocierea cu un aminoglicozid).

Benzatin penicilina G (moldamin sau penicilina retard) este o sare geu solubilă care administrată intramuscular asigură o concentrație activă pe o durată lungă de timp. De exemplu, o singură doză de 1.2 milioane UI (0.7 g) este suficientă pentru tratamentul faringitei streptococice cu streptococ de grup A şi al sifilisului primar. Doze succesive administrate odată la 3–4 săptămâni asigură profilaxia reinfecției cu streoptococi de grup A la pacienții cu febră reumatică.

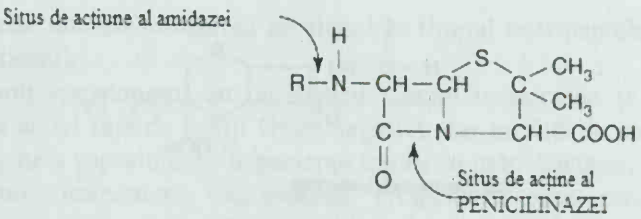
Stafilococii producători de ß-lactamază necesită tratament cu peniciline rezistente la ß-lactamaze (oxacilină).

Amoxicilina administrată oral se absoarbe mai bine decât penicilina şi asociată cu acidul clavulanic este extrem de eficientă în terapia infecțiilor cu *H influenzae* şi a altor specii producătoare de ß-lactamază. Ticarcilina este foarte activă față de bacilii Gram negativi, fiind administrată în sepsisul cu bacterii Gram negative, asociată cu un aminoglicozid. Piperacilina este foarte activă față de *Pseudomonas sp.*

Penicilinele au toxicitate foarte scăzută comparativ cu alte clase de antibiotice, efectele secundare fiind rezultatul reacțiilor alergice la penicilină (alergenul major este acidul peniciloic, rezultat din hidroliza acidului 6-aminopenicilanic).

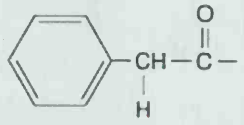
În doze foarte ridicate, pot produce ocazional iritații ale SNC (encefalopatie, delir, convulsii), sângerări, nefrită interstițială sau diaree.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

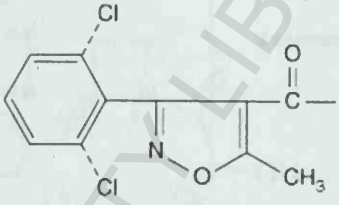


Acid 6 amino-penicilanic

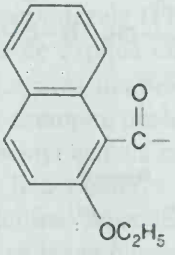
ÎN FUNCȚIE DE NATURA RADICALULUI, AU REZULTAT DIFERITE SUBCLASE DE PENICILINE



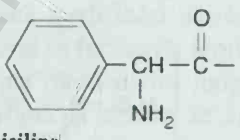
Penicilina G (benzil-penicilina)



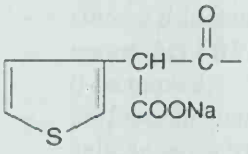
Oxacilina (fără atomi de Cl), cloxacilina (cu un atom de Cl), flucloxacilina (cu un atom de Cl si unul de F), dicloxacilina (2 atomi de Cl)



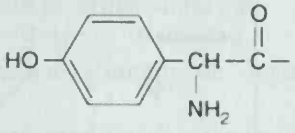
Nafcilina



Ampicilina



Ticarcilina



Amoxicilina

Cefalosporinele de generația I (CG I) (cefalotin, cefazolin, cefalexin etc) sunt foarte active față de cocii Gram pozitivi, mai puțin enterocii și stafilococii producători de ß-lactamază și moderat active față de *E coli, Proteus* sp. și *Kebsiella* sp (fig. 364).

Cefalosporinele de generația a II-a (CG II) (cefamandol, cefuroxim, cefaclor, cefoxitin, cefotetan, cefprozil) au un spectru similar cu al celor precedente, dar sunt active față de *Proteus* sp. și *Kebsiella* sp., dar nu asupra pseudomonadelor (fig. 363).

Cefalosporinele de generația a III-a (CG III) (cefotaxim, ceftazidim, ceftriaxon, cefotetan, ceftizoxim, cefoperazon, cefixim) au activitate redusă asupra cocilor Gram pozitivi, exceptând *S. pneumoniae*; enterococii sunt rezistenți în mod natural. În schimb, sunt foarte active față de bacilii Gram negativi, inclusiv *P. aeruginosa* și *Burkholderia pseudomallei* (fig. 363).

De asemenea, pot traversa bariera hematoencefalică, cefotaximul, ceftriaxona și ceftizoximul fiind administrate intravenos pentru tratamentul sepsisului și meningitei produse de bacterii Gram negative.

Cefalosporinele de generația a IV-a (CG IV) (cefpiroma, cefepimul) prezintă activitate față de tulpinile de *Enterobacter* și *Citrobacter* rezistente la celelalte cefalosporine, față de *P. aeruginosa,* streptococi și stafilococi sensibili la nafcilină (fig. 363).

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY
B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

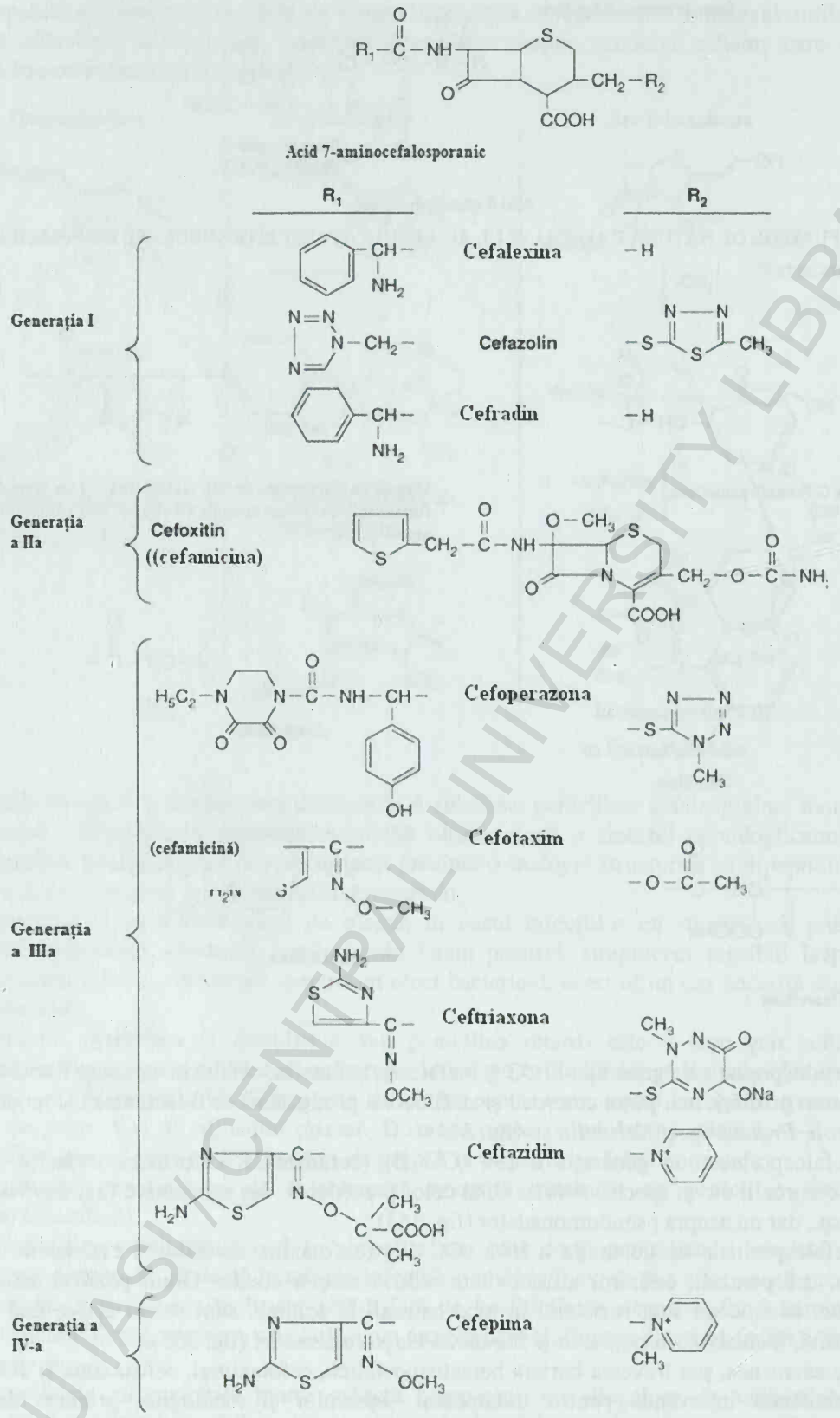


Fig. 363. Structura diferitelor cefalosporine, raport cu nucleul de bază 7 aminocefalosporanic (Brooks şi colab., 2007).

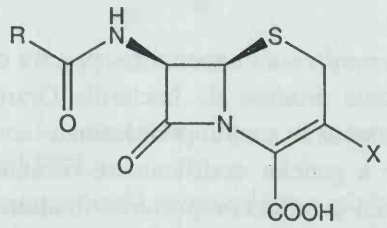
Cefalosporinele pot, de asemenea, genera reacţii de hipersensibilitate (alergia încrucişată cu penicilinele apare în 5% din cazuri), tromboflebită după administrarea intravenoasă, hipotrombinemie,

POLITEHNICA IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

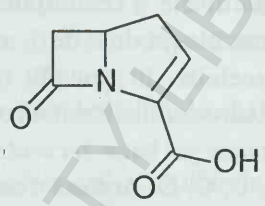
reacții disulfiram (este interzis consumul de alcool în timpul tratamentului), suprainfecții cu bacterii rezistente (ex. enterococi).

Monobactamii (aztreonam) au un nucleu lactam monociclic şi sunt rezistenți la acțiunea ß-lactamazelor, sunt activi față de bacili Gram negativi, dar nu față de coci Gram pozitivi şi bacterii anaerobe, care pot genera suprainfecții la pacienții tratați cu monobactami.

Carbapenemii (imipenem, meropenem, ertapenem) sunt rezistenți la acțiunea Ser-ß-lactamazelor, dar sunt inactivați de dihidropeptidaze la nivelul tubulilor renali şi de către metalo-ß-lactamaze. Sunt activi față de bacili Gram negativi, coci Gram pozitivi şi bacterii anaerobe, au o bună distribuție tisulară, traversează bariera hemato-encefalică.



Nucleu monobactamic



Nucleu carbapenemic

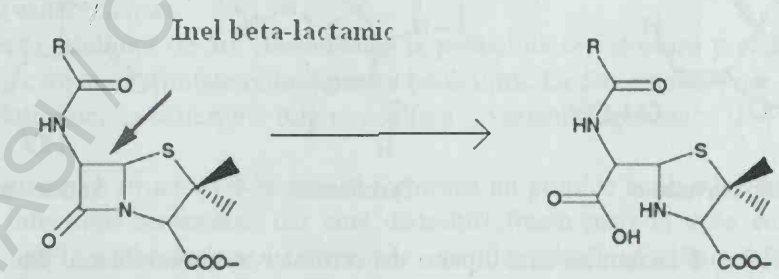
Transpeptidazele (PBP) sunt diferite la bacteriile Gram pozitive, Gram negative şi respectiv anaerobe, ceea ce explică într-o oarecare măsură diferențele activității antibacteriene a antibioticelor β-lactamice. Legarea unui antibiotic β-lactamic la PBP determină modificări morfologice ale celulei bacteriene: de exemplu, unele antibiotice se leagă de PBP implicată în formarea septului de diviziune.

Consecința este că celulele continuă să crească sub forma filamentelor lungi. Legarea de altă PBP duce la liza rapidă a bacteriei, deoarece peretele proemină şi celula se sparge. Mecilinam (amidino-penicilina) nu se leagă de PBP ale bacteriilor Gram pozitive şi nu influențează creşterea lor, iar aztreonam se leagă numai de PBP ale bacteriilor Gram negative şi nu inhibă creşterea celor Gram pozitive sau anaerobe.

Rezistența la antibioticele β-lactamice este conferită pe următoarele căi:

- *sinteza β-lactamazelor*;
- *mutațiile PBP*, al căror efect este reducerea afinității de legare cu antibioticele β-lactamice;
- *înglobarea diminuată* a antibioticelor datorată modificării de permeabilitate a peretelui celular sau activității pompelor de eflux.

Cel mai important mecanism de rezistență la antibioticele β-lactamice constă în sinteza enzimelor cu efect hidrolizant asupra antibioticelor. Unul dintre primele rapoarte cu privire la rezistența la antibiotice s-a referit la o tulpină bacteriană producătoare de β–lactamază, *o enzimă ce hidrolizează legătura β-lactamică* a acestei clase de antibiotice.



Penicilina **Acid peniciloic**

Această legătură este esențială pentru activitatea antibioticelor β-lactamice, deoarece are rolul de analog al legăturii peptidice ce leagă D-ala terminală a peptidului de monomerul peptidoglicanic. β-lactamazele sunt enzime foarte eficiente: o singură moleculă poate hidroliza peste 100.000 de

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

molecule β-lactamice. β-lactamazele sunt o familie mare de enzime cu structură unitară, toate clivează ciclul β-lactamic şi inactivează antibioticul, dar diferă prin secvenţa aminoacizilor. Spectrul lor de activitate este restrâns. β-lactamazele s-au diversificat prin mecanismul mutaţiilor punctiforme ce se acumulează gradat în genele codificatoare.

Clasificarea β-lactamazelor. β-lactamazele s-au clasificat în funcţie de *substratul pe care-l hidrolizează*, de *sensibilitatea la inhibitori,* de *modul de producere* (constitutiv sau inductibil) şi de *localizarea* cromosomală sau plasmidială a genelor codificatoare.

β-lactamazele pot fi *penicilinaze* (cele care acţionează asupra penicilinelor) sau *cefalosporinaze* (hidrolizează cefalosporinele) (fig. 365). Unele au spectru larg de acţiune (cele care hidrolizează penicilinele şi cefalosporinele).

β-lactamazele produse de *S. aureus* şi *S. epidermidis* sunt exoenzime, pe care celula le elimină în mediul extracelular, în cantităţi mari. β-lactamazele produse de bacteriile Gram negative sunt endoenzime, pe care celula le sintetizează şi le concentrează în spaţiul periplasmic.

Clasificarea pe baza *secvenţei de nucleotide* a genelor codificatoare recunoaşte 4 clase de β-lactamaze: A, B, C, D. Această clasificare este stabilă şi reflectă raporturile fundamentale ce nu pot fi modificate de mutaţii.

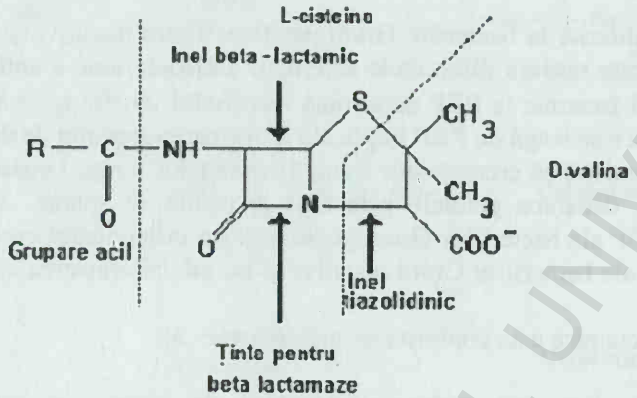
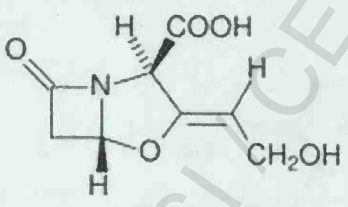


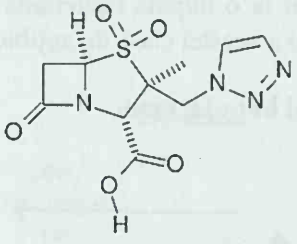
Fig. 365. Situsurile de acţiune a β-lactamazelor (indicate de săgeţi).

Enzimele din clasele A, C şi D au *serină* la situsul activ, iar cele din clasa B au *4 atomi de Zn.*

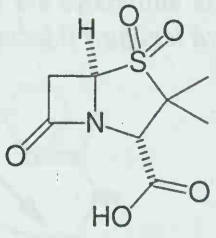
β-lactamazele claselor A şi B sunt foarte active faţă de benzil-penicilină, peniciline şi cefalosporine, şi respectiv carbopereni. Enzimele clasei C sunt în general inductibile, dar mutaţiile genelor codificatoare pot duce la supraexpresie. Enzimele clasei D sunt de tip *OXA*, deoarece hidrolizează preferenţial oxacilina.



Acid clavulanic



Tazobactam



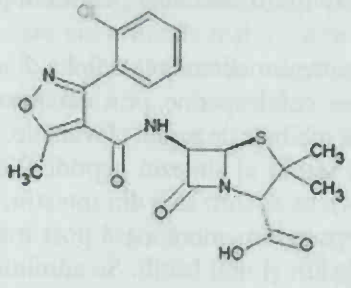
Sulbactam

Unele antibiotice ß-lactamice sunt lipsite de activitate antimicrobiană, dar leagă cu mare afinitate ß-lactamazele (acid clavulanic, tazobactam, sulbactam). Acestea sunt utilizate în asociaţie cu penicilinele sau cefalosporinele, pentru a extinde spectrul acestora asupra bacteriilor producătoare de ß-lactamaze codificate plasmidial, sensibile la inhibitori, inclusiv ß-lactamaze de spectru larg, care hidrolizează penicilinele şi cefalosporinele (CGI, CGII, CGIII şi CGIV).

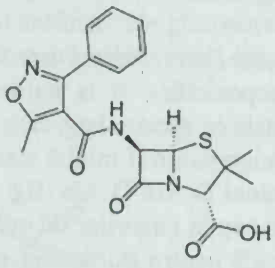
Unele ß-lactamaze, codificate de gene cromosomale, sunt rezistente la inhibitori de tipul acidului clavulanic.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

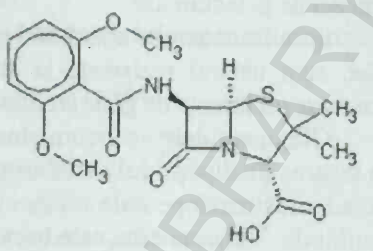
Penicilinele de tipul cloxacilinei, meticilinei, oxacilinei, nafcilinei sunt rezistente la acțiunea ß-lactamazelor, probabil datorită lanțului R lung care impiedică legare enzimei la nucleul ß-lactamic.



Cloxacilină



Oxacilină



Meticilină

ß-lactamazele de clasă B, care au în centrul catalitic Zn, sunt sensibile la chelatorii de metale bivalente de tipul EDTA.

Rezistența naturală prin scăderea afinității între ținta bacteriană și antibiotic. Micoplasmele, bacterii lipsite de perete celular, sunt natural rezistente la acțiunea antibioticelor care acționează la acest nivel (enzimele PBP). La alte specii bacteriene, PBP manifestă afinitate naturală slabă pentru antibioticele β-lactamice. Este cazul aztreonamului, inactiv asupra bacteriilor Gram pozitive și anaerobe stricte (Georgopapadakou, 1982), cefsulodinului inactiv față de enterobacterii (Barry, 1981) și cefalosporinelor și penicilinei M inactive față de enterococci.

Rezistența bacteriilor Gram pozitive la β-lactamice. Utilizarea în clinică pe scară largă a β-lactamilor, constituie factorul major selectiv care influențează sinteza β-lactamazelor de către agenții patogeni.

S. aureus este de obicei rezistent la benzil-penicilină, deoarece majoritatea tulpinilor izolate (80–95%) produc penicilinază.

Rezistența tulpinilor de *S. aureus* la meticilină se datorează legării antibioticului de către PBP, cu rol în sinteza peretelui celular. După legarea antibioticului, PBP se inactivează și sinteza peretelui celular este inhibată. Expresia genei este constitutivă sau inductibilă de către unele antibiotice β-lactamice. Rezistența la concentrațiile mici de meticilină se datorează producerii β-lactamazei, creșterii nivelului PBP sau diminuării afinității de legare a antibioticului de proteinele implicate în sinteza peretelui celular (PBP).

Rezistența la concentrațiile mari este totdeauna dependentă de sinteza unei noi variante biochimice a PBP (PBP_2), codificată de gena *mecA*, cu localizare cromosomală. Proteina PBP_2 are o afinitate mică pentru cele mai multe antibiotice β-lactamice. Expresia genei *mecA* este constitutivă sau inductibilă în prezența unor antibiotice β-lactamice. Rezistența la meticilină a tulpinilor de *S. aureus* (MRSA) este mai mare la 30°C decât la 37°C. În unele cazuri, singurele medicamente eficiente pentru tratamentul infecțiilor cu *S. aureus* rezistente la meticilină sunt antibioticele glicopeptidice (vancomicina).

Rezistența tulpinilor de *Str. pneumoniae* la penicilină se datorează prezenței PBP modificate, în special PBP_2, care au o afinitate redusă pentru penicilină. La *Str. pneumoniae*, β-lactamazele nu au fost niciodată detectate, dar diferitele tulpini codifică 6 variante biochimice de PBP: PBP 1a, 1b, 2a, 2b, 2x și PBP3.

Antibioticele cu structură β-lactamică formează un grup de antibiotice larg utilizate în clinică pentru terapia infecțiilor bacteriene, dar sunt deosebiri foarte mari în ceea ce privește spectrul și intensitatea acțiunii antibacteriene. Diferențele se datorează afinității diferite de legare cu transpeptidazele bacteriene, enzime implicate în sinteza peretelui celular sau cu enzimele care inactivează antibioticul (β-lactamaze).

Rezistența naturală la β-lactamice prin β-lactamaze la bacilii Gram negativi. La *Klebsiella*, rezistența este legată de sinteza unei β-lactamaze cromosomale cu spectru larg care antrenează rezistența la peniciline, anulată prin administrarea de inhibitori enzimatici ca acidul clavulanic, sulfbactam sau tazobactam.

COMSATS INSTITUTE OF INFORMATION TECHNOLOGY LIBRARY

La *Enterobacter* sp., *Serratia* sp., *Morganella* sp., *Providencia* sp., *Ps. aeruginosa*, rezistența este determinată de producerea unei β-lactamaze cromosomale de tipul cefalosporinazei (Bush, 1995).

Rezistența celulelor de *Ps. aeruginosa* se datorează permeabilității scăzute a peretelui, precum și sintezei de β-lactamaze.

Speciile anaerobe aparținînd genului *Bacteroides* și care fac parte din microbiota tubului digestiv al omului, sunt natural rezistente la aminopeniciline și la numeroase cefalosporine prin producerea de β-lactamaze codificate de gene cromosomale cu spectru larg, care sunt inhibate de acidul clavulanic.

Glicopeptidele (vancomicina, teicoplanina) inhibă stadiul inițial al sintezei peptidoglicanului (prin legarea de dipeptidul carboxi-terminal D-Ala-D-Ala (fig. 364), se absorb slab din intestin, așadar nu se administrează pe cale orală, cu excepția cazurilor de colită pseudomembranoasă post tratament cu antibiotic. Vancomicina este bactericidă pentru stafilococi, clostridii și unii bacili. Se administrează intravenos în tratatmentul infecțiilor cu stafilococi rezistenți la meticilină, iar în endocardită sau sepsisul cu enterococi se asociază cu o penicilină.

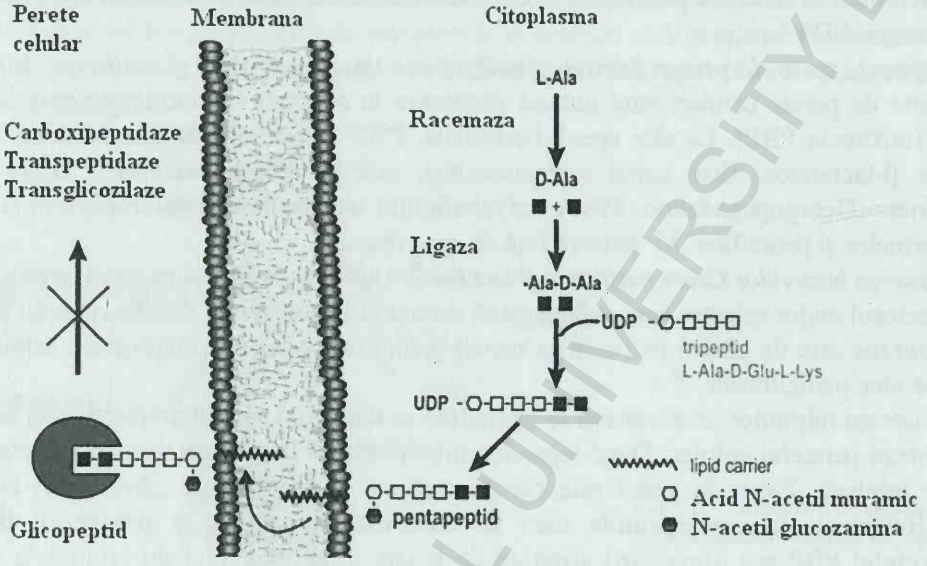
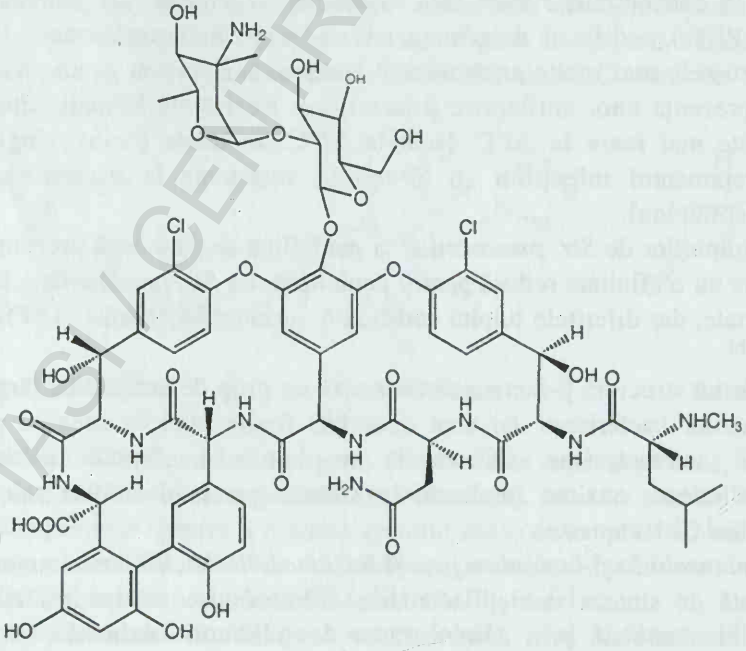


Fig. 364. Reprezentarea etapelor biosintezei peptido-glicanului și a mecanis-mului de acțiune a vanco-micinei (Courvalin, 2006).

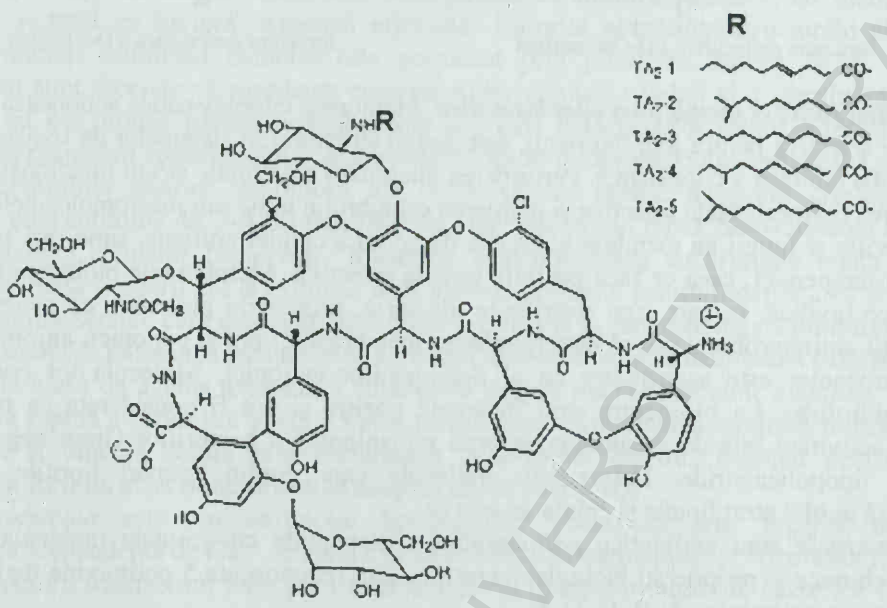


Structura vancomicinei

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Teicoplanina are structură similară cu cea a vancomicinei, este activă față de stafilococi, streptococi, enterococi şi alte bacterii Gram pozitive. Cocii Gram pozitivi (*Leuconostoc* sp.) şi *Lactobacillus* sp. sunt rezistenți pentru că lanțul lateral al peptidoglicanului constă din D-alanil-D-lactat, care are afinitate mai mică pentru antibioticele glicopeptidice.

Ca efecte secundare, pot apărea tromboflebita, erupții cutanate, leucopenie, ototoxicitate, nefrotoxicitate.



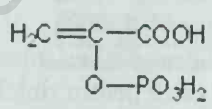
Structura teicoplaninei

Bacitracina (un peptid ciclic) împiedică defosforilarea moleculei lipidice purtătoare, ce transferă molecula de peptidoglican nou sintetizată, prin membrana celulei, în timpul sintezei peretelui celular. Este toxică pentru rinichi şi de aceea nu se administrează sistemic, dar se aplică local pentru tratamentul leziunilor tegumentare şi ale membranelor mucoase.

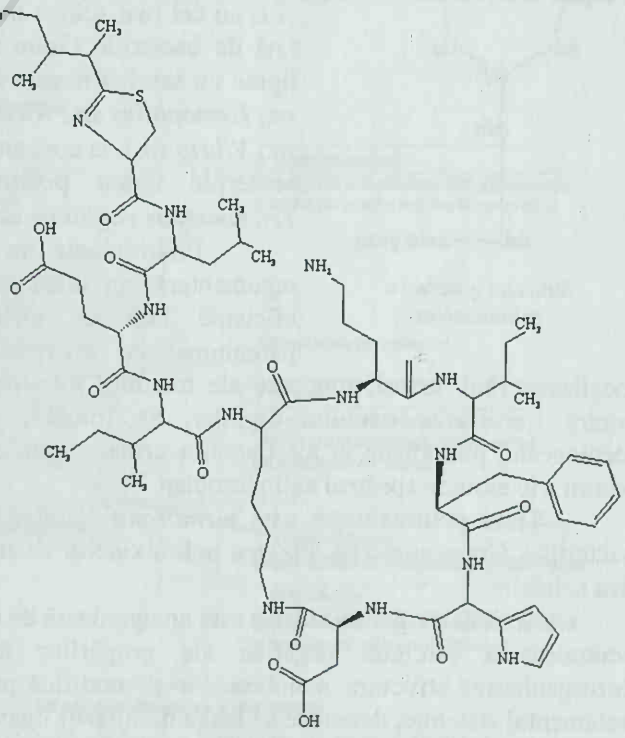
Cicloserina inhibă competitiv formarea D-ala din L-ala şi astfel stopează sinteza dipeptidului D-ala-D-ala. Este relativ toxică şi se foloseşte pentru tratamentul infecțiilor cu *M. tuberculosis*, rezistent la alte medicamente.

Fosfomicina este un inhibitor al piruvil-transferazei şi astfel blochează sinteza acidului N-acetil-muramic.

Cicloserina şi fosfomicina se comportă ca analogi ai precursorilor peptidoglicanului. Sunt molecule foarte hidrofile şi pătrund în citoplasmă pe calea sistemelor de transport pentru metaboliții înruditi: *fosfomicina* este anologă structural cu *fosfo-enol-piruvatul*, iar *cicloserina* este analogă D-alaninei:

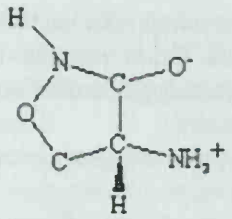


Structura moleculară a fosfo-enol-piruvatului

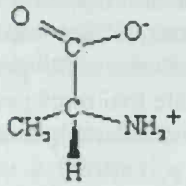


Structura bacitracinei

BCU "SPIRU HARET" UNIVERSITY LIBRARY



Structura moleculară a D-Cicloserinei



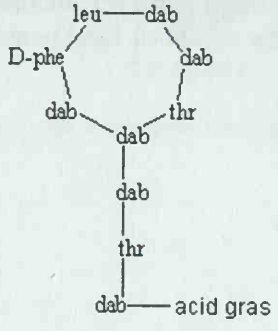
Structura moleculară a D-Alaninei

Inhibiția funcției membranei citoplasmatice. Membrana citoplasmatică acționează ca barieră de permeabilitate selectivă pentru ioni, nutrienți, este sediul structural al sistemelor de transport și controlează compoziția chimică a citoplasmei. Perturbarea integrității structurale și/sau funcționale atrage după sine modificarea permeabilității selective și pierderea echilibrului ionic sau macromoleculelor.

Bacteriile și fungii au membrană diferită de aceea a celulei animale, fiind mai ușor lezată de diferiți agenți terapeutici, ceea ce face posibilă terapia selectivă. Membranele biologice sunt alcătuite dintr-o matrice lipidică, în care sunt distribuite aleatoriu, proteinele globulare ce penetrează stratul lipidic. Agenții antimicrobieni pot să dezorganizeze membranele: pot fi cationici, anionici sau neutri. Efectul polimixinelor este asemănător cu al detergenților cationici. Molecula lor conține grupări hidrofile și hidrofobe. La pH neutru sunt încărcate pozitiv și pot fi considerate ca niște compuși cationici, cu activitate față de membrana externă polianionică a bacteriilor Gram negative, sarcină conferită de lipopolizaharide. Detergenții, molecule care conțin grupări lipofile și hidrofile, dezorganizează dublul strat lipidic și celula se sparge.

Polimixinele sunt antibiotice *polipeptidice* (octapeptide cu greutate moleculară mare), cu caracteristici chimice și proprietăți biologice identice. Sunt recunoscute 5 polimixine majore, distincte chimic, desemnate polimixina A, B, C, D, E.

dab = acid 1-diaminobutiric



Structura generală a polimixinelor

Cele mai reprezentative sunt *polimixina B* și *polimixina E* sau *colistina.* Toate sunt sintetizate de *Bacillus polymyxa* și au același spectru antibacterian. Sunt active în concentrații asemănătoare, dar produc efecte secundare semnificative. Polimixinele A și D sunt nefrotoxice și nu au fost niciodată folosite în clinică, iar polimixinele B și E au cel mai scăzut nivel de toxicitate. Aceste antibiotice sunt active față de bacteriile Gram negative, deoarece membrana externă conține lipide cu sarcină negativă (*Acinetobacter sp., Brucella sp., Escherichia sp., Hemophilus sp., Klebsiella sp., Yersinia sp., Salmonella sp., Shigella sp., Vibrio sp.*), la concentrații de până la 5 μg/ml. Nu sunt active față de bacteriile Gram pozitive, cocii Gram negativi și micobacterii. *Trichomonas vaginalis* este sensibil la concentrația de 125–250 μg/ml.

Polimixinele nu sunt absorbite după administrare orală sau tegumentară, nu difuzează semnificativ în țesuturi. De aceea nu sunt eficiente față de infecțiile sistemice difuze sau ale organelor parenhimatoase profunde, dar se folosesc în tratamentul infecțiilor localizate: răni, arsuri, mucoase ale tractului intestinal, cavitatea pleurală, spațiul dural, grefe sau pentru sterilizarea tractului digestiv. Se folosesc cu mare eficiență în tratamentul infecțiilor meningeale, pulmonare și ale tractului urinar. Polimixinele se asociază frecvent cu alte antibiotice, pentru a le extinde spectrul antimicrobian.

Ținta polimixinelor este *membrana lipidică*, adică membrana externă și citoplasmatică a bacteriilor Gram negative. Fixarea polimixinelor de membrane duce la dezorganizarea acestora și la liza celulei.

Activitatea polimixinelor este antagonizată de compușii anionici, de Mg^{2+} și de Ca^{2+}, deoarece neutralizează sarcinile negative ale grupărilor fosfat din membrana lipidică. Polimixinele dezorganizează structura membranelor și modifică profund permeabilitatea. Nu se folosesc pentru tratamentul sistemic, deoarece se leagă de diferiți liganzi tisulari și sunt toxice pentru rinichi și pentru sistemul nervos.

BUMF UNIVERSITY LIBRARY

Fixarea antibioticelor în structura membranei depinde de concentrația cationilor bivalenți din mediu: carența sau excesul acestora inhibă acțiunea polimixinelor. Compoziția în LPS, fosfolipide și proteine a membranelor bacteriene influențează de asemenea fixarea și gradul de sensibilitate sau de rezistență al diferitelor specii bacteriene la acțiunea polimixinelor. Polimixina și alte molecule policationice se leagă de lipidul A al LPS, într-un raport stoichiometric și se inseră în structura membranei. Un astfel de mozaic molecular dezorganizează straturile lipidice, iar membrana nu mai funcționează normal ca barieră osmotică eficientă. Datorită alterărilor structurale ale membranei externe și interne, echilibrul osmotic este perturbat prin pierderea ionilor de K^+. Modificările permeabilității sunt asociate cu pierderea constituenților celulari solubili și a viabilității. Mecanismul este același cu cel propus pentru hemoliză sub acțiunea detergenților ionici. Efectul hemolitic se datorează dezorganizării complexului colesterol-fosfolipide-lipoproteine din membrana eritrocitului.

Concentrațiile minime inhibitorii ale polimixinelor opresc temporar creșterea bacteriilor sensibile, iar concentrațiile de 2–4 ori mai mari au efect bactericid rapid. Sensibilitatea nu depinde de faza de creștere a celulelor bacteriene. Bacteriile sensibile leagă cu afinitate înaltă polimixinele. Specificitatea înaltă a legării stă la originea unei metode eficiente pentru îndepărtarea endotoxinei din plasma pacienților septici, care este perfuzată printr-o coloană la care este legată polimixina.

Rezistența se datorează incapacității antibioticului de a penetra membrana externă.

O altă clasă de agenți terapeutici cu acțiune asupra membranei sunt *ionoforii*, compuși care permit difuzia rapidă a cationilor specifici prin membrană: valinomicina mediază trecerea specifică a ionilor de K și omoară celula prin perturbarea echilibrului electric, esențial pentru fosforilarea oxidativă. Ionoforii nu au acțiune selectivă asupra celulei bacteriene.

Daptomicina este un antibiotic lipopeptidic, bactericid prin legarea de membrana citoplasmatică, dependentă de Ca^{2+}. Efectul este depolarizarea membranei și eliberarea K^+ intracelular. Se folosește pentru tratamentul infecțiilor tegumentare și tisulare produse de bacteriile Gram pozitive rezistente la ß-lactami și vancomicină.

Alți agenți ce acționează asupra membranei citoplasmatice sunt amfotericina B, colistinul, imidazolii și triazolii.

Inhibiția sintezei proteinelor

O serie de clase de antibiotice acționează specific asupra ribosomilor 70S, blocând astfel la diferite niveluri sinteza proteică (fig. 366).

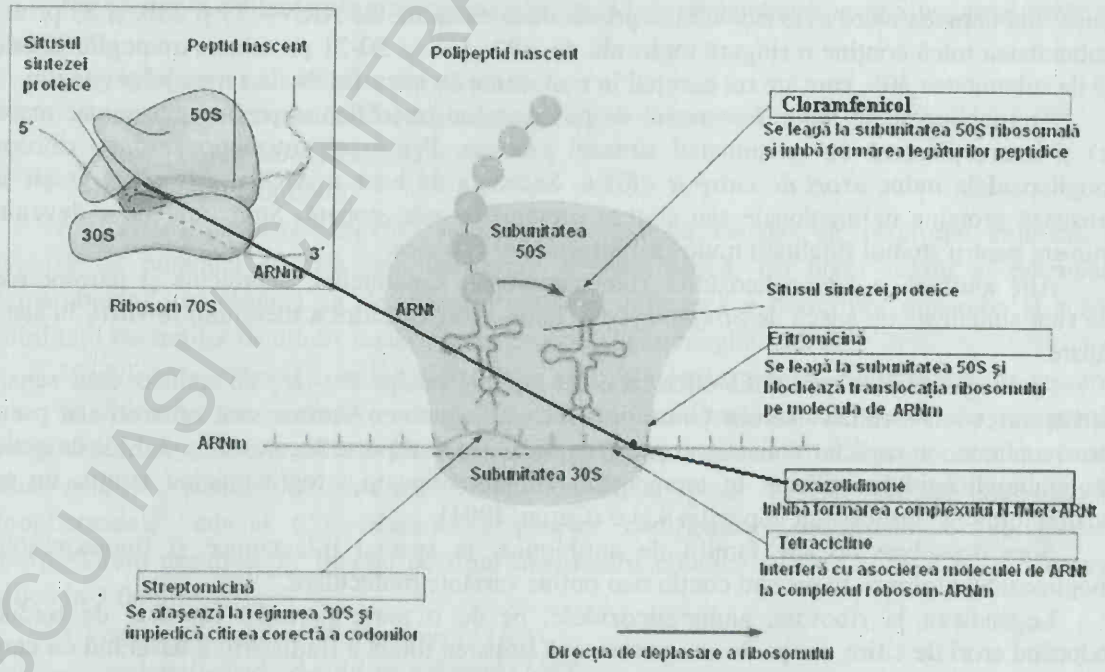
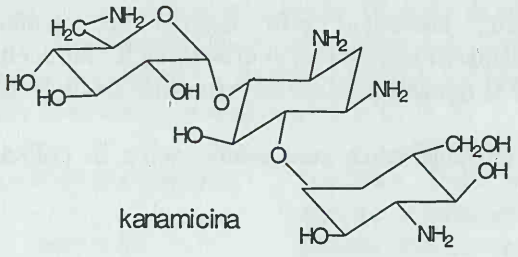


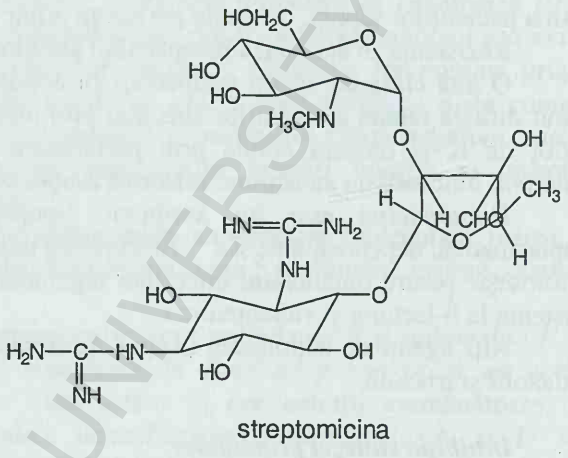
Fig. 366. Situsuri de acțiune ale diferitelor clase de antibiotice inhibitoare ale sintezei proteice (http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/micro%20resources.htm).

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aminoglicozidele sunt molecule *cationice* cu greutate moleculară mică, dar foarte *hidrofile*, care se acumulează în celulă numai printr-un proces de *transport dependent de energie*. Acumularea lor în celula bacteriană parcurge două faze: faza I este lentă şi depinde de gradientul transmembranar al potenţialului electric şi deci de sinergonul respirator oxidativ; faza a II-a este rapidă şi se traduce printr-o acumulare intracelulară importantă. Concentraţiile intracelulare sunt de circa 100 ori mai ridicate decât cele din mediul extern. Acumularea lentă a antibioticului determină un efect *bacteriostatic*, iar acumularea rapidă produce efectul *bactericid*. Rata acumulării este condiţionată de mărimea componentei electrice ($\Delta\psi$), a forţei proton-motrice care la rândul ei depinde de funcţionarea *catenei de respiraţie* şi de ATP-aza membranară. Astfel se explică de ce microorganismele cu sisteme transportoare deficiente, cum sunt cele anaerobe, sunt intrinsec rezistente la aminoglicozide. Din acelaşi motiv, enterococii şi alţi anaerobi facultativi sunt rezistenţi la concentraţiile mici de aminoglicozide.

Un rol important în acumularea intracelulară a aminoglicozidelor îl au proteinele periplasmatice a căror sinteză este indusă de antibiotic.





Aminoglicozidele se leagă de *ribosomii bacterieni* şi inhibă sinteza proteinelor. Ribosomul este o structură complexă, în alcătuirea căruia intră 3 molecule de ARN şi peste 50 de tipuri de proteine. Subunitatea mare a ribosomului cuprinde două molecule de ARN – 5S şi 23S, şi 33 proteine, iar subunitatea mică conţine o singură moleculă de ARN 16S şi 20-21 proteine. Aminoglicozidele se leagă de subunitatea 30S, care are rol esenţial în traducerea cu mare fidelitate a mesajului genetic.

Aminoglicozidele induc fenomenul de *pleiotropism* (modifică expresia unui număr mare de gene) şi interacţionează cu mecanismul sintezei proteice. Pentru că interacţionează cu ribosomii, aminoglicozidele induc *erori de citire a ARNm.* Secvenţa de baze a ARNm este citită greşit şi se sintetizează proteine nefuncţionale sau sinteza proteinelor este stopată. Streptomicina a devenit un instrument pentru studiul fidelităţii traducerii informaţiei genetice.

Alte antibiotice aminoglicozidice (bluensomicina, kanamicina, neomicina şi paromomicina (toate sunt sintetizate de specii de *Streptomyces*), induc erori de citire a mesajului *in vitro*, în sisteme acelulare.

Aminoglicozidele sunt antibiotice cu efect rapid şi cu spectru larg de acţiune: sunt sensibile bacteriile strict sau facultativ aerobe Gram pozitive sau negative. Acestea sunt zaharuri sau pseudo-zaharuri aminate, cu caracter policationic, care explică câteva aspecte legate de modul lor de acţiune. Toate aminoglicozidele utilizate în terapeutică, streptomicina şi streptinomicina conţin un ciclu deoxistreptomicină bisubstituit în poziţia 4 şi 6 (Caron, 1994).

Spre deosebire de alte familii de antibiotice, în special β-lactamice şi fluoroquinolone, aminoglicozidele folosite în prezent conţin mai puţine variante moleculare.

Legându-se la ribosom, aminoglicozidele, pe de o parte perturbă procesul de traducere introducând erori de citire, iar pe de alta antrenează stoparea totală a traducerii, interferând cu etapele

BUAM / AGRONOMY UNIVERSITY LIBRARY

de inițiere, alungire și terminare. Efectul primar al aminoglicozidelor ar fi *ocuparea situsului acceptor* (A) *al ribosomului.*

Streptomicina este un glicozid aminociclitol, larg folosit în terapia tuberculozei. La micobacterii, streptomicina inhibă sinteza proteinelor după 5–15 minute, iar sinteza acizilor nucleici continuă pentru o lungă perioadă de timp. Deoarece inhibă sinteza proteinelor, efectul aminoglicozidelor este *bactericid.* Streptomicina se leagă de proteina S12 din subunitatea 30S și face ca ribosomul să citească greșit codul genetic. Alte aminoglicozide se leagă nu numai de proteina S12, ci și de proteina L6 a subunității 50S. Acest ultim situs de legare este important pentru rezistența bacteriilor la aminoglicozide. Componenta chimică ce determină citirea greșită este streptamina sau deoxistreptamina, din moleculele de streptomicină, kanamicină, neomicină, paroromicină, gentamicină, bluensomicină etc.

Spectinomicina este un antibiotic aminociclitol, înrudit cu aminoglicozidele și care are acțiune bacteriostatică. Acțiunea sa antibacteriană constă în legarea cu o altă proteină ribosomală. Este astfel blocată interacțiunea ARNm-ribosom, fără să producă citirea greșită. Se folosește pentru tratamentul gonoreii (*N. gonorrhoeae*) rezistente la penicilină. În scopul tratamentului infecțiilor intracelulare, aminoglicozidele au fost încapsulate în liposomi. Încapsularea în liposomi poate să crească indexul terapeutic al medicamentului prin diminuarea nivelului medicamentului eliberat la situsurile unde este toxic față de nivelul eficienței terapeutice.

Aminoglicozidele sunt eliminate prin filtrare glomerulară și sunt parțial reabsorbite de celulele tubulare proximale printr-un mecanism de pinocitoză în vezicule mici, care fuzionează cu lizosomii, unde se acumulează. Ele induc o fosfolipidoză lizosomală caracterizată prin inhibiția activității sfingomielinazei și fosfolipazei A_1 și prin acumularea fosfolipidelor în lizosomi. Fosfolipidoza este însoțită de necroză celulară și regenerare postnecrotică.

Diferiți compuși sau medicamente administrate concomitent cu aminoglicozidele pot să mărească nivelul toxicității (vancomicina, cisplatinul și hidrocortizonul) sau pot să-l diminueze (ticarcilina, carbenicilina, cefalotina, acidul poli-L-aspartic). Toxicitatea aminoglicozidelor nu este influențată de modul de administrare (singure sau în asociație), dar unele medicamente diminuează nivelul renal al acumulării în celulele tubulare.

Rezistența la antibioticele aminoglicozidice este larg răspândită și se produce prin următoarele mecanisme:

- *înglobarea scăzută a antibioticului;*
- *modificarea enzimatică a aminoglicozidelor;*
- *modificarea țintei ribosomale;*
- *efluxul antibioticului;*

Înglobarea aminoglicozidelor necesită funcționarea catenei de respirație celulară, care generează un potențial electric prin membrana citoplasmatică. Un nivel scăzut al potențialului transmembranar sau absența sa determină rezistența intrinsecă a bacteriilor anaerobe și scăderea sensibilității bacteriilor facultativ anaerobe (enterococi) la aminoglicozide.

Modificarea chimică a aminoglicozidelor este principalul mecanism de rezistență bacteriană.

Modificarea enzimatică a aminoglicozidelor este mecanismul major de rezistență la aminoglicozide al izolatelor clinice Gram pozitive și Gram negative. Modificarea chimică are loc la nivelul grupelor *amino* sau *hidroxil.* S-au identificat peste 50 de enzime care modifică aminoglicozidele (tabelul 65). Majoritatea genelor codificatoare ale enzimelor se găsesc la bacteriile Gram negative. În funcție de tipul modificării chimice pe care o catalizează, acestea se clasifică în 3 familii:

- *aminoglicozid-acetil-transferaze* (AAC);
- *aminoglicozid-adenilil-transferaze* (ANT);
- *aminoglicozid-fosfotransferaze* (APH).

Tabelul 65.

Determinismul genetic al mecanismelor de rezistență enzimatică la aminoglicozide și distribuția acestora la diferite genuri și specii bacteriene (după Shaw și colab., 1993)

Enzima	Gene	Substratul enzimatic	Comentarii
Acetilare			
AAC(3)-I	*aac(3)-Ia* *aac(3)-Ib*	Gm	
AAC(3)-II	*aac(3)-IIa* *aac(3)-IIb* *aac(3)-IIc*	Gm, Tob	
AAC(3)-III	*aac(3)-IIIa* *aac(3)-IIIb* *aac(3)-IIIc*	Gm, Tob, Km, Neo, Prm	*Pseudomonas spp.* Rar întâlnite la *Enterobacteriaceae*
AAC(3)-IV	*aac(3)-IVa*	Gm, Tob	*Salmonella spp.*
AAC(3)-VI	*aac(3)-VIa*	Gm	Nu conferă rezistență la Tob și Km. Rar întâlnite la *Enterobacteriaceae*
AAC(6')-I	*aac(6')-Ia* *aac(6')-Ib* *aac(6')-Ic* *aac(6')-Id* *aac(6')-Ie* *aac(6')-If* *aac(6')-Ig* *aac(6')-Ih* *aac(6')-Ii*	Tob, Amk	
AAC(6')-II	*aac(6')-IIa* *aac(6')-IIb*	Gm, Tob	Numai la *Ps. aeruginosa*
AAC(6')-APH(2")	*aac(6')-aph(2")*	Gm, Tob, Amk	Enzimă bifuncțională la stafilococci și enterococci
AAC(2'-I)	*aac(2')-Ia*	Gm, Tob	
Adenilare			
ANT(2")-I	*ant(2")-Ia* *ant(2")-Ib* *ant(2")-Ic*	Gm, Tob, Km	Larg răspândite la bacteriile Gram negative
ANT(3")-I	*ant(3")-Ia*	Sm, Spcm	
ANT(4')-I	*ant(4')-Ia*	Tob, Amk	
ANT(4')-II	*ant(4')-IIa*	Tob, Amk	
ANT(6)-I	*ant(6)-Ia*	Sm	Larg răspândite la bacteriile Gram pozitive
Fosforilare			
APH(2")-I	*aph(2")-Ia*	Gm, Tob, Amk	
APH(3')-I	*aph(3')-Ia* *aph(3')-Ib* *aph(3')-Ic*	Km, Neo, Prm	
APH(3')-II	*aph(3')-IIa*	Km, Neo, Prm, GmB	
APH(3')-III	*aph(3')-IIIa*	Km, Neo, Prm, Amk, GmB	*S. aureus* *E. faecalis*
APH(3')-IV	*aph(3')-IVa*	Km, Neo, Prm	
APH(3')-V	*aph(3')-Va* *aph(3')-Vb* *aph(3')-Vc*	Neo, Prm	
APH(3')-VI	*aph(3')-VIa* *aph(3')-VIb*	Km, Neo, Prm, Amk, GmB	*Acinetobacter spp.*
APH(3')-VII	*aph(3')VIIa*	Km, Neo	*Campylobacter jejuni*
APH(3")-I	*aph(3")-Ia* *aph(3")-Ib*	Sm	*Streptomyces griseus*
APH(6)-I	*aph(6)-Ia* *aph(6)-Ib* *aph(6)-Ic* *aph(6)-Id*	Sm	*Streptomyces spp.*

Abrevieri: Amk, amikacină; Gm, gentamicină, GmB, gentamicină B; Km, kanamicină; Neo, neomicină; Pm, paromicină; Spcm, spectinomicină; Sm, streptomicină; Tob, tobramicină.

Aminoglicozid O-fosfo-transferaza (APH) și *aminoglicozid O-adenil* sau *nucleotidil-transferaza* (AAD sau ANT), catalizează *fosforilarea* și respectiv *nucleotidilarea grupării hidroxil*, iar *aminoglicozid-N-acetiltransferaza* (AAC) catalizează acetilarea grupărilor *amino*. APH și ANT folosesc ATP și ACA (acetil-coenzima A).

BUASVM / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fiecare dintre aceste familii de enzime este împărțită în clase, desemnate prin situsul pe care-l modifică (fig. 367).

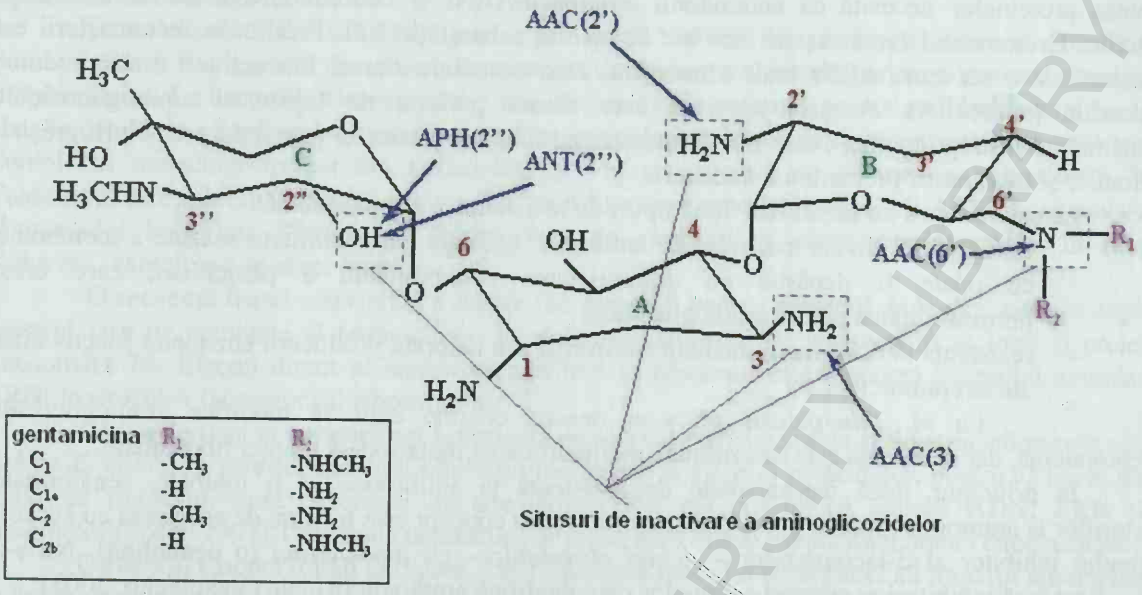


Fig. 367. Situsurile moleculei de gentamicină la nivelul cărora acționează diferite enzime inactivatoare (Mingeot-Leclercq și colab, 1999).

Aminoglicozid-fosfotransferazele – APH – (7 clase) sunt kinaze, utilizează ATP ca substrat secundar și fosforilează grupările specifice OH, la toate clasele de antibiotice aminoglicozidice.

Aminoglicozid-acetiltransferazele – AAC – (4 clase de enzime) utilizează acetil-CoA ca donor al grupării acetil pentru modificarea aminoglicozidelor la gruparea *amino* din pozițiile 1 și 3 ale inelului deoxistreptaminei și la pozițiile 2' și 6' ale inelului 6-aminohexozei. Aminoglicozid 6'-acetiltransferazele au spectru larg și pot modifica majoritatea aminoglicozidelor cu importanță clinică.

Aminoglicozid-nucleotidiltransferazele – ANT – (5 clase) utilizează ATP ca substrat secundar și modifică antibioticele aminoglicozidice prin transferul AMP la gruparea OH la pozițiile 2'', 3'', 4' și respectiv 9.

Aminoglicozidele modificate la grupările *amino* sau la grupul *OH* sub acțiunea celor trei categorii de enzime, se leagă slab sau pierd total capacitatea de a se lega de ribosomi și nu declanșează faza a II-a a înglobării – dependentă de energie.

Efectul inhibitor asupra sintezei proteinelor celulare nu se mai produce și bacteriile supraviețuiesc în prezența medicamentului. Inactivarea enzimatică a aminoglicozidelor este mecanismul principal de rezistență a stafilococilor. Din punct de vedere biochimic, acest mecanism de rezistență este de departe cel mai important, fiind implicat în totalitatea cazurilor de rezistență observate la enterobacterii (> 95%), la *Acynetobacter* (95%) și la bacteriile Gram pozitive și jumătate din cazurile de rezistență observate la *Pseudomonas*.

Mecanismele neenzimatice de rezistență la antibioticele aminoglicozidice sunt:

- *sistemele de eflux;*
- *mutațiile ARNr.*

Rezistența datorată modificării țintei macromoleculare este o modalitate majoră de dezvoltare a rezistenței. Modificările țintei care determină rezistența la aminoglicozide includ schimbările mutaționale ale proteinelor ribosomale sau ale ARN 16S și metilarea enzimatică a ARNr. Schimbările mutaționale produc rezistența în special la streptomicină. Studiile de RMN (rezonanță magnetică nucleară) asupra nucleotidelor ce cuprind situsul A (acceptor) al ARN 16S, complexat cu paromomicina, precum și asupra subunității 30S complexată cu același antibiotic, relevă că medicamentul se leagă în depresiunea majoră a situsului A. Metilarea N_7 a resturilor de guanină ale

LUCIAN BLAGA UNIVERSITY LIBRARY

ARN 16S produce rezistența la concentrații mari de aminoglicozide la microorganismele producătoare de aminoglicozide, dar acest tip de rezistență n-a fost raportat la bacteriile cu importanță clinică. Sinteza proteinelor necesită ca anticodonii aminoacil-ARNt şi codonii ARNm să se recunoască specific. Evenimentul recunoaşterii are loc la nivelul subunității 30S. Fidelitatea recunoaşterii este garantată de o secvență ARNr înalt conservată, care constituie situsul interacțiunii dintre codon şi anticodon (situsul A). Această secvență este situsul preferat de legare al aminoglicozidelor (kanamicina şi streptomicina), care pot să interfere cu sinteza proteinelor prin inducerea citirii greşite a codonilor şi terminarea prematură a traducerii.

La enterococi s-au identificat două tipuri de rezistență la streptomicină:

- rezistența la nivele moderate de antibiotic, datorată permeabilității scăzute a membranei, ce poate fi depăşită cu administrarea concomitentă a penicilinei, care creşte permeabilitatea pentru aminoglicozide;
- rezistența la doze mari, mediată ribosomal sau datorată producerii enzimelor inactivatoare ale streptomicinei.

La *M. tuberculosis* nu s-au descris enzime care să modifice aminoglicozidul streptomicină, dar rezistența este determinată de modificarea mutațională a țintei ribosomale.

În principiu, dacă mecanismele de rezistență la antibiotice ar fi inhibate, sensibilitatea bacteriilor la aminoglicozide ar putea fi restabilită. Acest concept este inspirat de asocierea cu succes a primului inhibitor al β-lactamazelor – *acidul clavulanic* – cu *amoxicilina* (o penicilină). Nu s-au identificat însă inhibitori ai sintezei enzimelor care modifică aminoglicozidele (Vakulenko, 2003).

Streptomicina produce efecte secundare: este afectat nervul acustic şi apar deficiențe de auz, care pot dispărea după întreruperea tratamentului sau pot să persiste.

Toxicitatea aminoglicozidelor se datorează faptului că sunt cationi polari, filtrați de glomerulul renal şi excretați nemodificați în urină. În tubii renali, aminoglicozidele sunt reabsorbite prin legarea de fosfolipidele membranare anionice, urmate de endocitoză şi sechestrare în lizosomi. Se crede că la o anumită concentrație prag, lizosomii se rup, eliberează enzimele hidrolitice şi produc necroza tisulară.

Tetraciclinele formează o familie de antibiotice *inhibitoare ale sintezei proteinelor* prin mecanismul blocării ataşării complexului aminoacil-ARNt la situsul acceptor al ribosomului (situsul A). Efectul bacteriostatic al acestor antibiotice are un spectru larg de acțiune, fiind active față de bacterii Gram pozitive şi Gram negative, față de chlamidii, micoplasme, ricketsii şi protozoare.

Tetraciclinele sunt agenți chelatori puternici, proprietățile lor farmacologice sunt influențate de prezența ionilor metalici. Fiecare dintre inelele nucleului linear tetraciclic trebuie să conțină numai atomi de C, pentru ca antibioticul să-şi păstreze activitatea. Excepția este *6-tiotetraciclina*, care deşi posedă un atom de S la poziția 6 a inelului C, are acțiune antibacteriană.

Tetraciclinele atipice (tiotetraciclina şi alți analogi ai tetraciclinelor) perturbă *structura membranei* citoplasmatice şi efectul este *bactericid*, ceea ce contrastează cu efectul bacteriostatic reversibil al tetraciclinelor inhibitoare ale sintezei proteinelor. Efectul atipic de dezorganizare a membranei este probabil consecința caracterului lipofil al moleculei, rezultată din planaritatea inelelor B, C şi D. Tetraciclinele atipice sunt probabil încorporate în mediul hidrofob al membranei. Din cauza efectelor secundare, derivate din interacțiunea lor nespecifică cu membranele celulelor procariote şi eucariote, tetraciclinele atipice nu prezintă interes terapeutic.

În mod obişnuit, se utilizează *tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina*, dar şi cele noi, de semisinteză: *minociclina* şi *doxiciclina*. Toate sunt bacteriostatice, se absorb uşor din tubul digestiv şi se distribuie larg în țesuturi şi fluide, cu excepția lichidului cefalorahidian.

Tetraciclinele au un *spectru foarte larg* de acțiune: sunt active față de multe bacterii Gram pozitive şi Gram negative, față de rickettsii, chlamidii, micoplasme şi față de unii fungi, dar distrug şi microbiota normală a intestinului şi produc tulburări gastro-intestinale. Tetraciclinele pot produce efecte toxice asupra țesutului hepatic şi renal. Tetraciclina administrată în timpul sarcinii poate duce la deformarea oaselor cutiei craniene a fătului. Administrarea în timpul sarcinii sau în primii 5 ani de

viață are ca rezultat colorarea dinților, atât deciduali, cât și permanenți, doarece mugurii ambelor dentiții se formează înainte de naștere. Efectele tetraciclinelor asupra dinților și oaselor se datorează capacității lor de a lega ioni de Ca^{2+}.

Tetraciclinele difuzează liber (pasiv) prin porii hidrofili ai membranei externe a bacteriilor Gram negative, dar necesită un sistem de transport dependent de energie pentru a traversa membrana citoplasmatică. La bacteriile Gram pozitive (nu au membrană externă), aceste antibiotice nu difuzează liber în celulă. În citoplasmă formează complexe cationice cu Mg^{2+}, datorită activității lor chelatoare. Complexul molecular format din tetraciclină și Mg se asociază cu subunitatea ribosomală 30S. Consecința este inhibiția sintezei proteinelor, prin blocarea asocierii aminoacil-ARNt la situsul A al ribosomului bacterian. Tetraciclina inhibă faza de *elongare a catenei polipeptidice* în timpul traducerii, exercitând un efect *bacteriostatic*.

O secvență foarte conservată a ARNr 16S pare a fi parte a situsului de legare, ceea ce explică spectrul larg de activitate al tetraciclinei. În alcătuirea situsului de legare pare să intre și proteina ribosomală 7S. Efectul direct al legării tetraciclinei la ribosomi este blocarea accesului aminoacil-ARNt la situsul A (acceptor) al ribosomului.

Câțiva derivați ai tetraciclinei acționează pe altă cale: chelocardina și tiotetraciclina sunt active față de *E. coli* și *B. subtilis*, dar sunt inhibitori ineficienți ai sintezei proteinelor, pentru că nu se leagă stabil de ribosomi. Spre deosebire de alte tetracicline, ele pot inhiba sinteza ADN, ARN și a proteinelor (Speer, 1992). Cele două tetracicline ar putea avea efecte asupra membranei citoplasmatice.

Olivera și Chopra (citați de Speer, 1992), pe baza modului de acțiune, au împărțit tetraciclinele în două categorii:

- cele care *inhibă sinteza proteinelor* (teraciclina, clortetraciclina, minociclina);
- cele care interacționează cu *membrana citoplasmatică* (chelocardina, tiotetraciclina, anhidrotetraciclina).

Legarea tetraciclinelor cu proteinele ribosomului este tranzitorie, ceea ce explică efectul *bacteriostatic* al acestor antibiotice. Sunt inhibitoare față de o varietate largă de bacterii Gram pozitive și Gram negative, chlamidii și micoplasme. Celulele mamiferelor nu concentrează tetraciclina (așa cum fac bacteriile) și de aceea ribosomii lor sunt rezistenți, cu posibila excepție a ribosomilor 70S mitocondriali. Se administrează oral, dar formează complexe neabsorbabile cu ionii bivalenți. Tetraciclina și derivații săi au o utilizare clinică limitată, datorită frecvenței crescute a tulpinilor rezistente. De exemplu, în anii '80, tetraciclina era folosită pentru tratamentul infecțiilor cu transmitere sexuală, dar după apariția tulpinilor rezistente de *N. gonorrhoeae*, n-a mai fost utilizată ca antibiotic de primă importanță terapeutică. Oxitetraciclina și tetraciclina sunt încă folosite în tratamentul uretritei nongonococice și a infecțiilor chlamidiale.

Rezistența la tetraciclină este larg răspândită la cocii Gram pozitivi și se manifestă și la *Mycoplasma*. De aceea, tetraciclina nu se folosește pentru tratamentul primar al infecțiilor tractului respirator inferior. Deși acțiunea sa principală este antibacteriană, tetraciclina este activă față de protozoarele parazite: inhibă *Giardia lamblia, Trichomonas vaginalis, Entamoeba histolytica, Plasmodium falciparum*. Eficiența derivaților tetraciclinei față de protozoarele parazite este corelată cu gradul de pătrundere în celulă. Cei mai eficienți sunt derivații lipofili, care străbat repede membrana citoplasmatică (tiotetraciclina).

Numeroase specii bacteriene au dobândit *rezistență* la acțiunea bacteriostatică a tetraciclinelor. S-au identificat cel puțin 24 de *gene codificatoare ale rezistenței* la tetraciclină și 3 determinanți de rezistență la oxitetraciclină, mai întâi la *Streptomyces*, care produce oxitetraciclina și la *Mycobacterium* sp.

Rezistența determinată genetic (Taylor, 1996) este mediată prin mecanisme diferite:

- *protecția ribosomilor* prin intermediul proteinelor solubile;
- *pompe de eflux*, dependente de energie, care elimină tetraciclina din celulă;
- *impermeabilitatea*;
- *inactivarea enzimatică* (degradarea oxidativă) a antibioticelor.

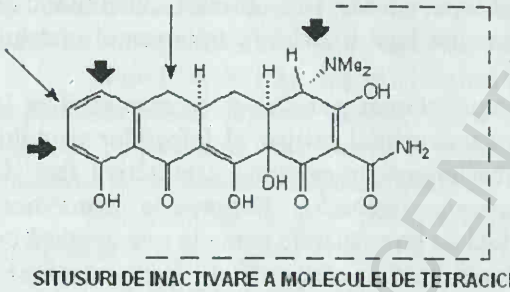
Mecanismul de acțiune a proteinelor de protecție ribosomală. Protecția ribosomală este rezultatul sintezei unor proteine codificate de genele de rezistență, care se asociază cu ribosomii și interferă cu legarea tetraciclinei. Tetraciclinele inhibă sinteza proteinelor prin legarea cu afinitate

înaltă, de un singur situs localizat pe subunitatea ribosomală 30S, probabil de proteinele S_7, S_{14} şi S_{19}. Legarea tetraciclinei în acest situs blochează legarea aminoacil-ARNt sintetazei la situsul ribosomal A (acceptor). Treapta sintezei proteice inhibată de tetraciclină este cea catalizată de EF-Tu (*e*longation *f*actor *t*hermo-*u*nstable).

Activitatea *pompelor de eflux* este o modalitate de a limita accesul tetraciclinei la ribosomi şi are ca rezultat creşterea capacităţii celulei de a elimina antibioticul la o rată egală cu rata înglobării. Este cel mai comun mecanism de rezistenţă, mediat de produsele de sinteză ale genelor de rezistenţă: acestea sunt proteine ale membranei citoplasmatice care funcţionează ca transportori ai tetraciclinei, dependenţi de energie. Deşi efluxul împiedică acumularea tetraciclinei chiar în celulele rezistente, nivelul intracelular al antibioticului depăşeşte nivelul inhibitor al sintezei proteinelor (B. Speer, 1992). Explicaţia se bazează pe capacitatea tetraciclinei de a exista în mai multe forme ionice. Este posibil ca o anumită formă să se lege mai uşor de ribosomi, comparativ cu altele. La tulpinile rezistente este eliminată forma activă a antibioticului, iar în celulă rămâne o concentraţie mare de tetraciclină inactivă sau mai puţin activă, compatibilă cu sinteza proteinelor.

Impermeabilitatea structurilor de suprafaţă ale celulei constituie o cauză importantă a rezistenţei la tetracicline. Pentru a inhiba sinteza proteinelor, tetraciclinele trebuie să pătrundă în celula bacteriană şi să se lege de ribosomi. Tetraciclina poate exista în două forme: o formă protonată (TH_2) şi o formă legată de Mg^{2+} (THMg). Proporţia $THMg^{2+}$ creşte la pH mai mare. Tetraciclina este acumulată în celulă ca $THMg^{2+}$, deoarece pH intern este mai mare decât cel extern. Forma protonată a tetraciclinei difuzează prin membrana citoplasmatică. Difuzia simplă nu explică faptul că bacteriile sensibile acumulează tetraciclină în citoplasmă. În afara difuziei, tetraciclina este înglobată printr-un mecanism dependent de energie, care nu implică o proteină de transport, ci diferenţa de pH între mediul celular şi extracelular. Alterarea porinelor, cu limitarea difuziei tetrciclinelor în spaţiul periplasmic, este un mecanism posibil de rezistenţă la bacteriile Gram negative.
Cele două mecanisme de rezistenţă la tetracicline (proteinele protectoare ale ribosomilor şi proteinele de eflux) nu inactivează antibioticul. Rareori, antibioticul este inactivat sau modificat pe cale chimică.

Inactivarea enzimatică a tetraciclinelor nu are semnificaţie ca mecanism de rezistenţă, dar s-a evidenţiat la *Bacteroides*. Câteva specii de *Bacteroides degradează oxidativ* molecula de antibiotic. Gena care codifică acest tip de rezistenţă este localizată pe 2 transpozoni înrudiţi, ce poartă de asemenea o genă de rezistenţă la eritromicină. Gena codificatoare a enzimei care degradează tetraciclina este inactivă la celulele de *E. coli* crescute în anaerobioză sau de *Bacteroides*.

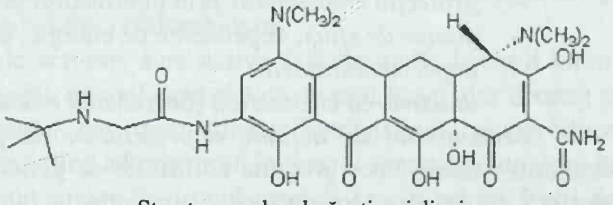


SITUSURI DE INACTIVARE A MOLECULEI DE TETRACICLINĂ

Modificări majore
Modificări minore
Aria critică de acţiune a enzimelor degradative

Gliciltetraciclinele sunt reprezentate de *tigeciclină,* utilizată pentru tratamentul infecţiilor cutanate şi intraabdominale. Caracteristica structurală a tigeciclinei constă în substituţia în poziţia 9 a tetraciclinei, cu un rest de glicină. Este un antibiotic cu spectru larg de acţiune faţă de bacterii Gram pozitive, Gram negative, aerobe şi anaerobe, dar şi faţă de bacterii patogene rezistente la alte antibiotice: enterococi rezistenţi la vancomicină, *S. aureus* meticilino-rezistent (MRSA), *Str. pneumoniae* rezistent la penicilină. Este activă faţă de patogenii Gram negativi: enterobacterii, *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae, Legionella pneumophila*, micobacterii netuberculoase cu creştere rapidă.

Dactilociclinele sunt derivaţi ai tetraciclinei, produşi de *Dactylosporangium*. Ele diferă de alţi derivaţi prin aceea că sunt *tetracicline glicozidice*. Utilizarea clinică este limitată, deoarece par să fie active numai faţă de tulpinile bacteriene care poartă gene de rezistenţă la tetraciclina din clasa K. Unele



Structura moleculară a tigeciclinei

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

izolate bacteriene sensibile la tetraciclină nu sunt inhibate de dactilocicline. Incapacitatea lor de a inhiba bacteriile Gram pozitive şi Gram negative se datorează probabil impermeabilităţii structurilor de suprafaţă faţă de dactilocicline (Speer şi colab., 1992).

Tetraciclinele se administrează oral, dar unele sunt disponibile ca produse pentru administrare parenterală. După administrare orală, tetraciclinele sunt absorbite în stomac şi în intestinul subţire. Absorbţia este influenţată de conţinutul alimentar şi de cationii bivalenţi. Cu ionii de Ca^{2+}, tetraciclinele formează complexe neabsorbabile. Ele pătrund moderat în fluidele organismului şi în ţesuturi şi sunt excretate prin urină.

Tetraciclinele sunt antibiotice cu spectru larg, fiind utilizate în clinica umană pentru tratamentul infecţiilor cu bacterii Gram pozitive şi Gram negative. Sunt de asemenea active faţă de agentul malariei şi se folosesc pentru profilaxia tulpinilor de *Plasmodium falciparum* rezistente la agenţii chimioterapeutici specifici.

Macrolidele, Lincosamidele şi Streptograminele (MLS) au o structură chimică diferită, dar acţionează într-o manieră asemănătoare asupra unei game variate de bacterii (Gram pozitive, coci Gram negativi, *Chlamydia*, micoplasme, *Legionella*). Absenţa efectului asupra bacililor Gram negativi se explică prin incapacitatea de a difuza prin membrana externă, datorită caracterului hidrofob al moleculei acestora. Macrolidele şi lincosamidele au proprietăţi antibacteriene, cel mai adesea *bacteriostatice*.

Situsul acţiunii macrolidelor este subunitatea mare a ribosomilor bacterieni. MLS acţionează asupra ribosomilor şi împiedică ribosomul bacterian să traducă ARN în două moduri diferite.

a) *Macrolidele inhibă sinteza proteică dependentă de ARN, la treapta alungirii catenei, producând inhibiţia translocării peptidil-ARNt de la situsul acceptor(A), la situsul peptidil donor* (P). Ele se leagă de subunitatea ribosomală 50S şi interferă cu procesul de translocaţie a polipeptidului nascent, deoarece stimulează disocierea complexului peptidil-ARNt de ribosomi, în timpul sintezei. Centrul peptidil-transferazei (din subunitatea 50S) este situsul interacţiunii antibioticelor MLS, al cloramfenicolului şi puromicinei şi pare a fi format în întregime de structura secundară a ARN 23S din bucla centrală a domeniului V(din cele 6 domenii). Consecinţa este terminarea prematură a catenei şi oprirea reversibilă a sintezei proteinelor. Pentru eritromicină este suficientă legarea unei singure molecule cu subunitatea mare a ribosomului. Eritromicina interacţionează cu ARNr, la nivelul unei bucle a unor domenii îndepărtate în structura primară a ARN, dar care prin pliere sunt aduse în juxtapoziţie: domeniile II şi V ale ARNr 23S. Macrolidele se leagă probabil la situsul *peptidil donor* (P) al ribosomului şi prin competiţie interferă cu translocaţia peptidului de la situsul acceptor la situsul donor. Eritromicina poate să producă disocierea peptidil-ARNt de ribosom. La *E. coli*, eritromicina inhibă formarea subunităţii ribosomale 50S.

b) *Al doilea mecanism de acţiune constă în inhibarea treptelor iniţiale ale asamblării subunităţii ribosomale 50S.* Macrolidele şi ketolidele interacţionează cu subunitatea 50S parţial asamblată, blocând procesul asamblării. Componentele neasamblate sunt supuse degradării nucleolitice. În celulele tratate cu eritromicină se acumulează un precursor al subunităţii 50S. Eritromicina se leagă de subunitatea incompletă formată din ARNr 23S, 5S, dar conţine numai 18 dintre cele 34 proteine ribosomale ale subunităţii mari. Situsul de legare la subunitatea ribosomală 50S este comun pentru eritromicină, pentru macrolidele noi, pentru lincosamidă şi streptogramina B.

Denumirea de *macrolide* desemnează un grup de antibiotice înrudite structural, produse de specii ale genului *Streptomyces*.

Grupul macrolidelor cuprinde numai compuşi nepolienici (de exemplu, eritromicina). Compuşii care conţin un sistem format din mai mult de două legături duble de C conjugate, sunt clasificaţi ca *poliene*. Din punct de vedere *structural*, macrolidele sunt caracterizate printr-un *inel lactonic* multiunitar, cu puţine legături duble, fără atomi de N, la care se ataşează, prin legături glicozidice, 1–3 componente glucidice. Macrolidele pot fi glucide aminate sau glucide fără N (neutre). Sunt poliketide naturale, produse ale metabolismului secundar la multe specii ale g. *Streptomyces*.

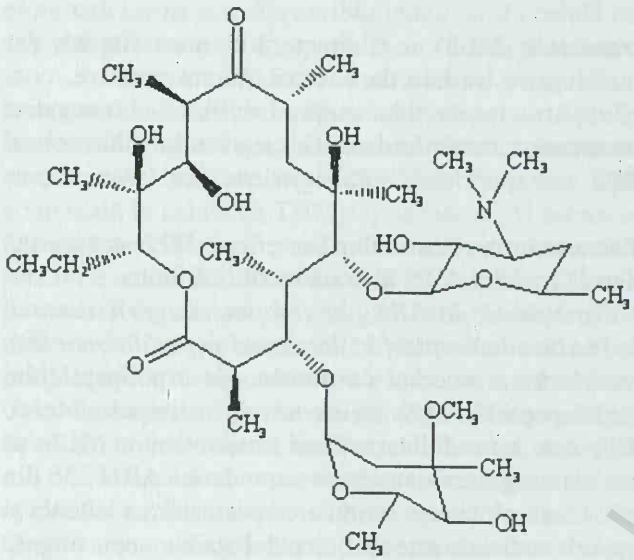
Macrolidele prezintă diferenţe structurale, dar posedă un schelet de C comun. După numărul de atomi de C ai inelului lactonic (de obicei par), se disting compuşi cu 12, 14, 15 sau 16, cu substituienţi variaţi (grupări metil, hidroxil). Prezenţa grupărilor determină asimetria centrilor inelului

lactonic. Componentele glucidice ataşate prin legături glicozidice de inelul lactonic sau legate una de alta, sunt totdeauna 6-deoxihexoze. Glucidele poartă grupări N-, O- sau metil. La unele macrolide, glucidele sunt esterificate de un acil: grupul acetil sau izovaleril.

Fiecare compus are caracteristici chimice cât şi biologice, proprii:

- majoritatea celor care au cicluri formate din *14 atomi* de C sunt substanţe naturale (eritromicina, oleandomicina) sau derivaţi semisintetici (roxitromicina, diritromicina, claritromicina);
- un singur compus are *15 atomi* (azitromicina);
- compuşi naturali cu *16 atomi* (josamicina, spiramicina, kitasamicina, midecamicina şi tilosina) sau derivaţi semisintetici (rokitamicina, miocamicina, tilmicosina).

Eritromicina, cel mai important antibiotic macrolid, este produsă de *Streptomyces erythreus*. Structura sa constă dintr-un *inel lactonic macrociclic*, de care se ataşează două resturi de zahăr.



Structura moleculară a eritromicinei

Eritromicina este puţin solubilă în apă şi este rapid inactivată de sucul gastric. Ca şi alte macrolide, penetrează greu peretele bacteriilor Gram negative. Eritromicina este un antibiotic cu spectru larg: este activă faţă de bacteriile Gram pozitive şi Gram negative, faţă de actinomicete, *Mycobacterium, T. pallidum, Micoplasma pneumoniae, Chlamydia, Rickettsia*. În funcţie de concentraţie, de specie, de faza de creştere sau de densitatea inoculului, eritromicina poate fi bacteriostatică sau bactericidă. Eritromicina este un înlocuitor al penicilinei, la persoanele alergice pentru ciclul β-lactamic.

Cele mai multe antibiotice macrolide sunt substanţe bazice, iar unele sunt neutre. Pot fi solubile sau insolubile în apă, dar solubile în etanol. Cele folosite în clinică constau dintr-un inel lactonic cu 14, 15 sau 16 atomi de C, substituit cu două sau mai multe *glucide* neutre sau aminate la C_3 şi C_5.

Macrolidele inhibă creşterea bacteriilor dar nu sunt active faţă de fungi, iar lactonele polienice inhibă fungii, dar nu influenţează creşterea bacteriilor.

Spectrul de activitate al macrolidelor include bacteriile Gram pozitive (*Staphylococcus* şi *Streptococcus*) şi pe cele anaerobe (*Clostridium*). Bacteriile Gram negative (*H. pylori, Haemophilus* spp., *Pasteurella* spp. şi *Legionella* spp.) sunt de asemenea sensibile. Microorganismele enterice (*E. coli* şi *Salmonella*) sunt intrinsec rezistente, prin excluderea macrolidelor din citoplasmă datorită arhitecturii membranei externe.

Moleculele noi, ca *azitromicina* şi *claritromicina* au activitate antibacteriană superioară eritromicinei, deoarece au coeficienţi superiori de penetrare intracelulară şi tisulară, sunt mai stabile, mai uşor absorbite, iar efectele secundare gastrointestinale au o incidenţă mai scăzută. *Azitromicina* este activă faţă de bacteriile enterice. *Mycoplasma* spp. şi *Chlamydia* spp. sunt de asemenea sensibile la macrolide. *Claritromicina* are activitate antibacteriană semnificativă, *in vitro*, faţă de micobacteriile netuberculoase.

Macrolidele sunt antibiotice bacteriostatice, utilizate pentru tratamentul unui spectru larg de infecţii bacteriene ale tractului respirator cu *Legionella, Chlamydia, Haemophilus*, al unor specii de *Mycobacterium* (*M. intracellulare, M. avium*, dar nu *M. tuberculosis*), al ulcerului gastric asociat cu *H. pylori* şi infecţii ale ţesuturilor moi.

Streptograminele sunt reprezentate de doi compuşi (A şi B) cu acţiune sinergică. Ca şi macrolidele şi lincosamidele şi compuşii A şi B ai streptograminelor se fixează la subunitatea 50S a ribosomilor, la nivelul ARNr 23S.

Lincomicina şi clindamicina nu sunt macrolide, dar multe dintre proprietăţile lor biologice sunt asemănătoare cu ale eritromicinei. Sunt formate dintr-un *aminoacid* legat cu un zahăr aminat.

Lincomicina este activă faţă de o largă varietate de bacterii, în primul rând Gram pozitive. Ele au aceleaşi situsuri de legare la subunitatea 50S ca şi macrolidele şi cloramfenicolul şi pot intra în competiţie pentru legare. Deşi sunt foarte diferite ca structură chimică, eritromicina şi clindamicina se leagă de subunitatea ribosomală 50S. Inhibă sinteza proteinelor prin interferenţă cu reacţia de transpeptidare, probabil prin blocarea situsului P (peptidil-donor). Astfel este blocată alungirea catenei peptidice. Efectul este bacteriostatic.

Macrolidele şi lincomicina sunt *bacteriostatice*: inhibă numai iniţierea noilor catene peptidice.

Utilizarea terapeutică a macrolidelor a fost sever compromisă de *emergenţa tulpinilor rezistente* ale multor specii de bacterii patogene. Fenomenul de rezistenţă a apărut curând după introducerea eritromicinei în terapie în anii '50. S-a observat că tulpinile rezistente la eritromicină, au devenit rezistente nu numai la toate celelalte macrolide, dar şi la lincosamidă şi streptogramină B, antibiotice neînrudite chimic cu macrolidele. De aceea, fenomenul s-a denumit «rezistenţa fenotipică la macrolide-lincosamide-streptogramină B» (MLS_B).

Rezistenţa la antibioticele MLS (macrolide, lincosamida şi streptogramina B) este indusă prin mai multe mecanisme:

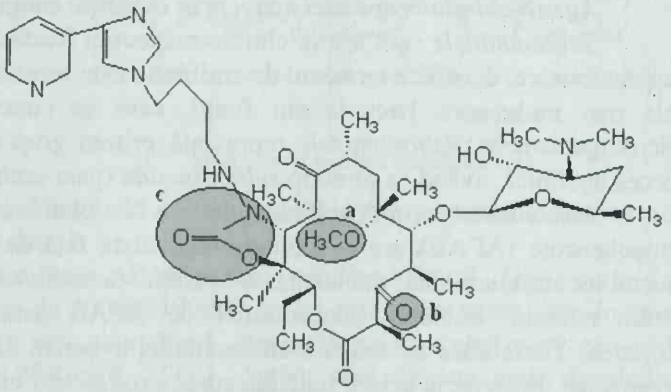
- scăderea *permeabilităţii* peretelui celular la medicament;
- *efluxul* activ al medicamentului din celulă;
- modificarea mutaţională a unei singure *proteine* a subunităţii 50S;
- *inactivarea enzimatică* a antibioticelor: enzimele care hidrolizează inelul lactonic al nucleului macrolid şi fosfotransferazele care inactivează macrolidele prin fosforilarea grupării 2'-OH a glucidului aminat;
- *modificarea ARNr 23S* al subunităţii 50S prin *metilare*. Metilazele sunt codificate de genele *erm* (*erithromycin ribosome methylation*);

Rezistenţa la macrolide este cel mai adesea rezultatul modificării ţintei antibioticului şi constă în modificarea posttranscriere a ARNr 23S sub acţiunea adenin-N^6-metiltransferazei. Unele metilaze conferă rezistenţă numai la unul sau la două antibiotice ale clasei MLS_B. Enzimele de metilare adaugă una sau două grupe metil la un rest de adenină situat într-o poziţie fixă (A2058 la *E. coli*) a ARNr 23S. Metilarea are ca rezultat *schimbarea conformaţională a ribosomilor*, ducând la scăderea afinităţii pentru toate antibioticele MLS. Metilaza ribosomală conferă *rezistenţă încrucişată* la antibioticele MLS_B, deoarece situsurile de legare ale acestor antibiotice se suprapun.

Ketolidele reprezintă o nouă entitate chimică, caracterizată prin înlocuirea L-cladinozei din inelul A al eritronolidei, cu o funcţie 3-ceto şi un carbamat la C11-C12. Restul 3-OH rămas după înlăturarea L-cladinozei (un glucid neutru) a fost oxidat la grupul 3-ceto. Denumirea clasei derivă de la gruparea 3-ceto şi de la inelul lactonic (Ackermann, 2001, citat de Rodloff, 2003). *Telitromicina* şi *ABT 773* reprezintă cea mai recentă generaţie de medicamente, caracterizate prin grupul 3-cetonic ce substituie restul de zahăr 3-cladinoză din eritromicină şi claritromicină.

Ambele ketolide au gruparea carbamat C11-C12, care la telitromicină se extinde cu un grup alkil-aril. Această extensie permite telitromicinei să interacţioneze cu domeniul al II-lea al ARNr 23S (Vester, 2001).

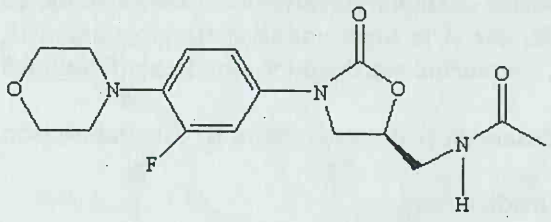
Oxazolidinonele reprezintă o clasă unică de agenţi antimicrobieni sintetici. Utilizarea lor în clinică a fost impusă de necesitatea tratării infecţiilor produse de stafilococii rezistenţi la meticilină, de pneumococii rezistenţi la penicilină, de enterococii rezistenţi la vancomicină. Aceşti agenţi au un mecanism unic de acţiune, ceea ce elimină riscul rezistenţei încrucişate cu



Structura moleculară a telitromicinei

agenții antimicrobieni disponibili. Deoarece nu sunt molecule naturale, genele de rezistență specifică nu preexistă în genofondul natural. Oxazolidinonele au fost inițial utilizate în terapie ca inhibitori ai monoamin-oxidazei, pentru tratamentul depresiei, dar ulterior s-a descoperit că au și activitate antimicrobiană. Primul agent al acestei clase a fost produs de compania DuPont de Nemours, la sfârșitul anilor '70 pentru controlul bolilor foliare bacteriene și fungice la diferite plante, inclusiv la tomate. Modificarea chimică a oxazolidinonei a dus la descoperirea a doi agenți, *eperezolid* și *linezolid*, cu activitate *in vitro* și toxicitate diminuată.

Linezolidul are activitate *in vitro* față de *N. gonorrhoeae* și *N. meningitidis* și are o eficiență bună față de multe bacterii Gram pozitive anaerobe (grupul *Bacteroides fragilis*). Bacteriile Gram negative sunt probabil intrinsec rezistente, deoarece posedă pompe de eflux, eficiente față de linezolid. *In vitro*, linezolidul are o eficiență relativ bună față de *M. tuberculosis* și foarte bună față de *Nocardia.*



Structura moleculară a linezolidului

Concentrațiile subinhibitorii de linezolid diminuează producerea hemolizinei și coagulazei la *S. aureus* și inhibă sinteza streptolizinei O și DN-azei la streptococi.

Oxazolidinonele sunt *inhibitorii sintezei proteinelor ribosomale* la bacterii, dar spre deosebire de alți agenți antimicrobieni cu acțiune asupra ribosomilor, blochează prima treaptă a asamblării ribosomilor din subunitățile disociate. Oxazolidinonele se leagă de un situs al subunității 50S, la interfața sa cu subunitatea 30S și previn formarea complexului de inițiere 70S, care cuprinde ARNt-fMet, ARNm și cele două subunități ribosomale.

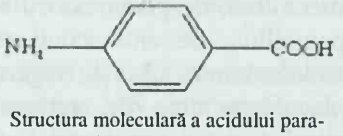
Linezolidul se leagă la sau lângă situsul de legare a cloramfenicolului și lincomicinei, deoarece cele 3 molecule intră în competiție pentru situsurile de legare din domeniul V al ARN 23S al subunității 50S. Domeniul V este centrul peptidil-transferazei, care catalizează formarea legăturii peptidice. Spre deosebire de cloramfenicol și lincomicină, linezolidul nu inhibă formarea legăturilor peptidice și între ele nu există rezistență încrucișată. Asemănător majorității inhibitorilor sintezei proteinelor ribosomale, activitatea linezolidului față de bacterii *in vitro* este considerată *bacteriostatică*, deoarece bacteriile sunt omorâte mai încet decât de agenții bactericizi. Linezolidul este metabolizat prin oxidarea inelului morfolino și se formează doi metaboliți: acidul aminoetoxiacetic și hidroxietil glicina. Linezolidul este un agent antimicrobian cu spectru larg, activ virtual față de toate bacteriile Gram pozitive. Întreaga cantitate administrată pe cale orală sau parenterală rămâne disponibilă acțiunii antimicrobiene. Perioada de înjumătățire permite administrarea a două doze/zi.

Un parametru esențial al unui agent chimioterapeutic este *indicele terapeutic*, adică raportul dintre doza toxică minimă și doza cu eficiență maximă. Valoarea mare a acestui raport este caracteristică agenților chimioterapeutici foarte eficienți.

Agenți chimioterapeutici activi prin inhibiție competitivă (tabelul 66)

Sulfonamidele sunt agenți chimioterapeutici foarte importanți din punct de vedere practic. Nu sunt antibiotice, deoarece termenul de antibiotic este rezervat substanțelor sintetizate de organisme, de cele mai multe ori, bacterii sau fungi, care în concentrații foarte mici inhibă sau omoară microorganismele. *Sulfonamidele* reprezintă primul grup de substanțe microbiostatice introduse cu succes în clinică, având ca prototip *sulfanilamida* (para-amino-benzen-sulfonamida).

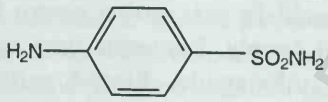
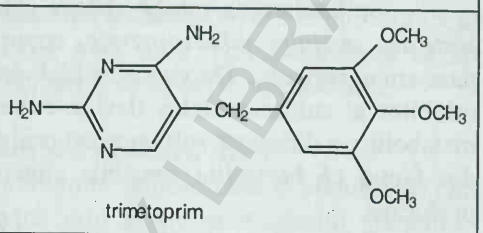
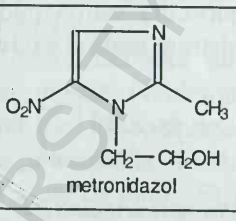
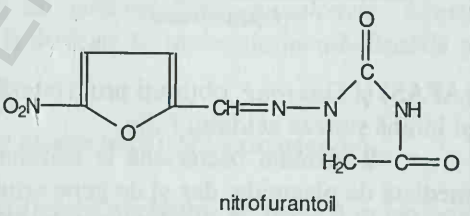
Mecanismul acțiunii sulfonamidelor a fost clarificat când Woods a demonstrat că acidul para-aminobenzoic (APAB) are o acțiune antagonistă față de aceste substanțe, în sensul că anihilează efectul lor antimicrobian: dublarea concentrației de inhibitor adăugat în mediu necesită dublarea concentrației de APAB pentru a relua creșterea. Toxicitatea selectivă a sulfonamidelor derivă din faptul că organismul uman preia acidul folic din surse externe, dar multe bacterii își sintetizează propriul acid folic.



Structura moleculară a acidului para-aminobenzoic (APAB)

Tabelul 66.

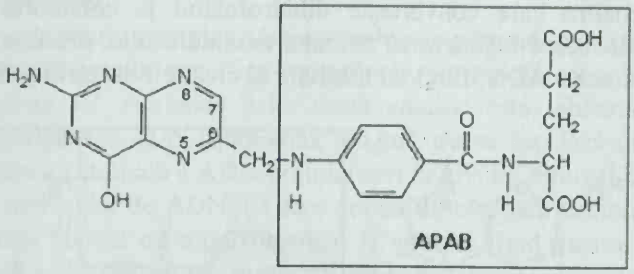
Agenţi chimioterapeutici care acţionează prin inhibiţie competitivă (adaptare după Topley şi Wilson's, 1998).

Clasa de agenţi chimioterapeutici	Ţinta specifică	Structura chimică
Sulfonamide	Inhibarea dihidropteroid sintetazei (DHPS)	 sulfonamide
Diaminopirimidina (Trimetoprim)	Inhibarea dihidrofolat reductazei	 trimetoprim
Nitroimidazoli	Interferă cu biosinteza timinei (produc ruperi ale moleculei de ADN)	 metronidazol
Nitrofurani (Nitrofurantoil)	Interferă cu biosinteza timinei (produc ruperi ale moleculei de ADN).	 nitrofurantoil

Acţiunea antagonistă a APAB nu este directă, ci se exercită prin intermediul metabolismului bacterian. APAB este un nutrient esenţial, fiind precursorul *acidului folic*, un factor de creştere pentru bacterii. Acidul folic şi formele sale reduse – acidul dihidrofolic şi tetrahidrofolic – transferă fragmente cu 1C derivate din serină, pentru sinteza metioninei, purinelor, timinei, tiaminei, pantotenatului (Black, 1996).

Datorită marii asemănări a structurii chimice a celor două substanţe (APAB şi sulfanilamida), între ele are loc un fenomen de *competiţie pentru intrarea în calea sintezei acidului folic.*

Enzima bacteriană implicată în conversia APAB la *acid folic* (pteridin-sintetaza), adeseori "greşeşte" şi se combină cu sulfanilamida, în loc de APAB. Astfel, sinteza acidului folic şi toată calea metabolică dependentă de acidul folic este blocată. Sulfanilamida intră în competiţie cu APAB pentru situsul activ al enzimei. Acest tip de inhibiţie este reversibil: dacă sulfanilamida este îndepărtată, enzima funcţionează normal. Cu cât raportul moleculelor de sulfanilamidă/APAB este mai mare, cu atât inhibiţia metabolismului bacterian este mai amplă.



Structura moleculară a acidului folic

Sulfonamidele au afinitate mai mare decât APAB pentru pteridin-sintetază. *Trimetoprim* (un analog al acidului dihidrofolic) are afinitate de 10000–100000 de ori mai mare pentru *dihidrofolat-reductaza* (DHFR) bacteriană decât pentru cea mamaliană. Această enzimă catalizează conversia dihidrofolatului la acidul tetrahidrofolic (Wistreich, 1996). Astfel, sunt blocate căile metabolice dependente de acidul folic, care acţionează ca purtător al grupărilor C1 şi este necesar pentru sinteza

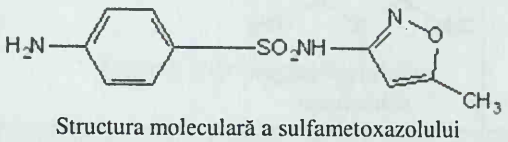
BANAT'S UNIVERSITY LIBRARY

ADN, ARN etc. Spre deosebire de mamifere, bacteriile şi protozoarele parazite nu au sistem de transport care să preia acidul folic preformat din mediul extern. Majoritatea acestor organisme trebuie să-l sintetizeze, deşi unele pot să folosească timidina exogenă, acoperind astfel necesarul metabolic.

Sulfamidele sunt toxice pentru bacteriile capabile să sintetizeze acidul folic, pornind de la molecule mai simple. Bacteriile care necesită aportul exogen al moleculelelor preformate, nu sunt sensibile la sulfonamide. Efectul sulfonamidelor este antagonizat necompetitiv (independent de creşterea concentraţiei) de un amestec de intermediari ai căii acidului folic.

Sulfanilamida inhibă sinteza acidului folic în stadiul timpuriu, prin inhibiţie competitivă cu *sintetaza acidului dihidropteroic*, enzima care catalizează condensarea dihidropteridinei cu acidul para-aminobenzoic. Deoarece acidul folic îşi păstrează activitatea în celulele bacteriene, efectul inhibitor al sulfonamidelor devine evident după câteva generaţii de celule, când cantitatea acestui metabolit s-a diminuat sub un nivel critic, prin distribuţie în celulele fiice. Toxicitatea selectivă derivă din faptul că bacteriile sensibile sintetizează acidul folic *de novo*, iar omul absoarbe cofactorul preformat.

Cele mai cunoscute sulfonamide sunt *sulfadiazina* şi *sulfametoxazol* (cotrimoxazol), bine absorbite după administrare orală şi excretate în urină.



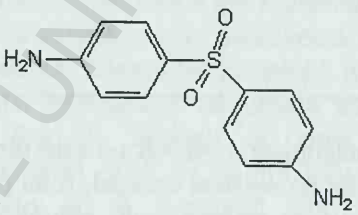
Structura moleculară a sulfametoxazolului (Cotrimoxazol)

Acţiunea derivaţilor sulfanilamidei este bacteriostatică faţă de bacteriile Gram pozitive şi Gram negative. Se folosesc în tratamentul infecţiilor vezicii urinare, cauzate în marea lor majoritate de *E. coli*. Circa 5% dintre pacienţi suferă efecte secundare, mai ales reacţii alergice, cu febră şi eritem tegumentar.

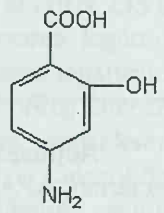
Ca şi sulfamidele, *acidul paraaminosalicilic* (APAS) şi *Dapsone*, obţinuţi prin sinteză chimică sunt inhibitori competitivi ai metabolismului APAB şi inhibă sinteza acidului folic.

Rezistenţa bacteriană la sulfonamide este mediată de plasmide, dar şi de gene cromosomale, prin hiperproducţia de acid p-aminobenzoic.

Familia derivaţilor *diaminopirimidinici* cuprinde *trimetoprim* şi *tetroxoprim*.

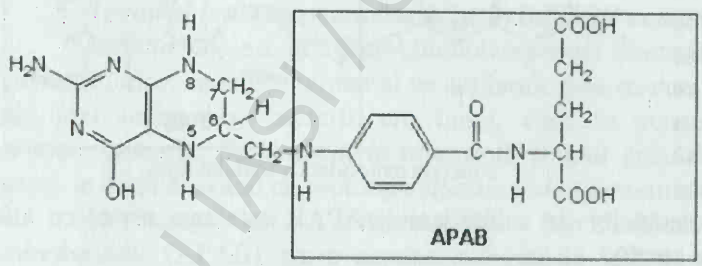


Structura moleculară a Dapsone



Structura moleculară a APAS (Acid para-aminosalicilic)

Trimetoprim este un analog al *acidului dihidrofolic*, component esenţial al sintezei aminoacizilor şi nucleotidelor. Agentul chimic blochează metabolismul dependent de acidul folic, dar la alt nivel decât sulfonamidele, a căror eficienţă o ridică foarte mult (Wistreich, 1996). Agentul inhibă competitiv *dihidrofolat-reductaza*, enzima care converteşte dihidrofolatul la cofactorul activ – *acidul tetrahidrofolic*. Trimetoprim blochează regenerarea acidului tetrahidrofolic, precursorul acidului folinic şi ulterior al purinelor şi al sintezei ADN, fiind un inhibitor al creşterii bacteriilor mai eficient decât sulfonamida.



Structura moleculară a acidului tetrahidrofolic

Blocajul secvenţial al aceleiaşi căi de biosinteză, sub acţiunea sulfonamidelor şi trimetoprim, determină un grad înalt de activitate sinergică faţă de un spectru larg de microorganisme.

Omul nu sintetizează acidul folic, dar necesită aportul exogen şi sinteza purinelor în celula umană nu este influenţată semnificativ de trimetoprim. Are acţiune selectivă deoarece este de 50.000–100.000 de ori mai activ faţă de dihidrofolat-reductaza bacteriană, comparativ cu cea umană.

Trimetoprim are spectru larg de acţiune: coci Gram pozitivi şi majoritatea bacililor Gram negativi, cu excepţia *Ps. aeruginosa* şi *Bacteroides*.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Rezistența mediată de gene cromosomale ori plasmidiale, este consecința dobândirii unei gene a dihidrofolat-reductazei (DHFR), mult mai puțin sensibilă la trimetoprim sau altor mecanisme: supraproducția DHFR, mutații ale genei structurale a DHFR sau dobândirea unei gene care codifică o enzimă rezistentă la DHFR. Genele ce codifică enzimele modificate se găsesc frecvent pe plasmide autotransferabile. Enzimele modificate sunt produse în celule, concomitent cu o dihidrofolat-reductază de tip sălbatic, dar cantitatea enzimei alterate depășește blocajul sintezei acidului folic mediat de efectul trimetoprimului asupra enzimei de tip sălbatic. Rezistența la sulfonamide se produce printr-un mecanism asemănător. Datorită rezistenței bacteriilor la sulfonamide, trimetoprim a fost introdus ca un sinergic al sulfonamidelor, în asociație cu care s-a administrat mult timp, considerându-se că are proprietăți antibacteriene slabe. Acum se administrează pe scară largă, ca agent terapeutic unic.

Agenți chimioterapeutici activi prin inhibiția replicării și transcrierii ADN

Quinolonele (denumite și 4-quinolone) sunt primele substanțe antimicrobiene obținute pe *cale sintetică* și formează o familie de compuși care se aseamănă prin existența nucleului *quinolinic*. Primul compus din acest grup, folosit în terapie este *acidul nalidixic*.

Quinolonele, alături de β-lactamice și macrolide, reprezintă una dintre cele trei familii principale de agenți antimicrobieni folosiți în terapeutica umană (Wolfson & Hooper, 1989). Importanța lor terapeutică este în continuă creștere începând din 1968, data comercializării primei quinolone, *acidul nalidixic*. Acidul nalidixic este un produs intermediar de sinteză a quinolonelor. Ulterior quinolonele s-au diversificat prin introducerea unui atom de *fluor* (F) în poziția 6 și a unui *heterociclu* în poziția 7 (piperazine, pirolidina etc.) care au generat *fluoroquinolonele*. Aceste molecule posedă un spectru antibacterian foarte larg și pot fi divizate în molecule *metabolizabile* și *nemetabolizabile* (grupele III și IV).

Quinolonele se pot clasifica în două grupe:

- cele de primă generație, ca *acidul nalidixic*, active asupra bacililor Gram negativi;
- de generația a II-a – *fluoroquinolonele*.

Gama derivaților quinolonei s-a diversificat prin modificarea nucleului de bază, 4-quinolona. La atomul C6 s-a adăugat unul de *fluor*, ceea ce a crescut semnificativ spectrul și potențialul lor antimicrobian. Având în vedere spectrul lor de activitate antibacteriană, limitat la bacterii Gram negative și în principal la enterobacterii, acidul nalidixic și derivații săi au fost folosiți pentru tratamentul infecțiilor urinare. Modificările structurii au dat naștere la quinolone, denumite *noile quinolone* sau *fluoroquinolone* (norfloxacin, pefloxacin, ofloxacin, ciprofloxacin etc.), al căror spectru de activitate antibacteriană se extinde la alte specii Gram negative (de exemplu, *Ps. aeruginosa*), dar și la anumite specii Gram pozitive (*S. aureus*) și micobacterii. Totuși, activitatea noilor quinolone față de alte specii, așa cum sunt cele natural-sensibile la acidul nalidixic, rămâne modestă, ceea ce corespunde unui anumit grad de rezistență intrinsecă a acestor specii.

Mecanismul de acțiune a quinolonelor este foarte complex. Aceste molecule pătrund în celula bacteriană prin *difuzie pasivă* și acționează asupra țintelor specifice reprezentate de *topoizomeraze*: *ADN–giraza (topoizomeaza II)* și *topoizomeraza IV*. Acțiunea celor două enzime este inhibată. Quinolonele se leagă și *stabilizează complexele girază-ADN* (quinolona singură nu se asociază cu ADN), după clivarea lanțului, împiedicând acțiunea catalitică a ADN-polimerazei la nivelul bifurcației de replicare. Complexul generează o rupere a moleculei de ADN, pe care celula nu o repară eficient (fig. 368). Fluoroquinolonele formează *complexe* stabile cu topoizomeraza II, efectul fiind moartea celulei. S-a sugerat că quinolonele nu se leagă cu ADN-giraza însăși, ci probabil chiar la situsuri specifice pe ADN, create de ADN-girază.

Studiile comparative ale sensibilității la fluoroquinolone și de dezvoltare a rezistenței au relevat că ADN-giraza este ținta primară a fluoroquinolonelor la bacteriile Gram negative, iar topoizomeraza IV este ținta primară la bacteriile Gram pozitive. Excepția o constituie *Streptococcus pneumoniae*, la care fie giraza, fie topoizomeraza pot fi ținte primare, în funcție de fluoroquinolona folosită.

Activitatea antibacteriană este dependentă într-o măsură semnificativă de atomul de fluor din poziția 6 și de nucleul piperazinic din poziția 7. Configurația spațială a quinolonei determină nivelul activității. Astfel, enantiomerii stereochimici (care diferă unul de altul numai prin poziția în spațiu a

unei grupări particulare), ce implică grupul metil atașat la inelul al III-lea de ofloxacin, au activități antibacteriene foarte diferite, care diferă în proporție de 1/10.

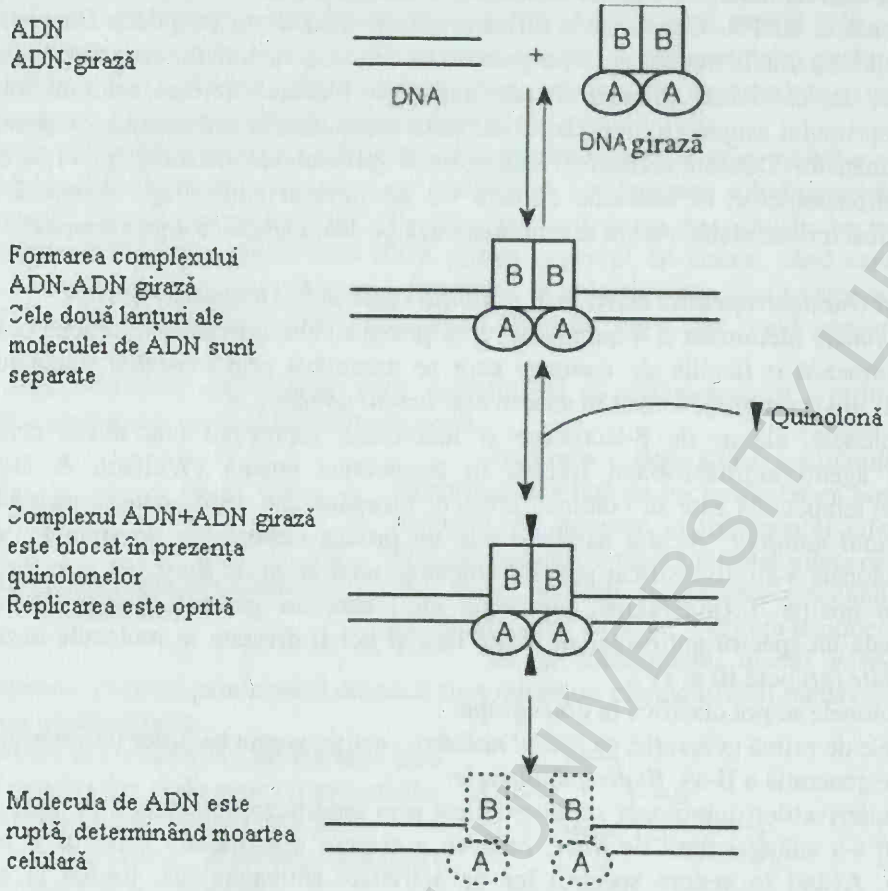


Fig. 368. Ilustrarea schematică a mecanismului acțiunii quinolonelor (după Drlica, 1999)

Quinolonele sunt agenți bactericizi. Ele stopează rapid sinteza replicativă a ADN şi întrerup progresia bifurcației de replicare. Inhibiția activității ADN-girazei sub acțiunea fluoroquinolonelor induce moartea rapidă a celulei bacteriene. Inhibiția rapidă a sintezei ADN nu explică moartea celulei bacteriene. Pentru efectul letal sunt necesare alte evenimente suplimentare: inhibiția sintezei ARN şi a proteinelor. La concentrațiile de quinolone care depăşesc un anumit prag, activitatea bactericidă diminuează, probabil pentru că este inhibată numai sinteza ARN şi a proteinelor.

Quinolonele induc probabil efecte pleiotrope, ce pot fi consecințe secundare ale inhibiției sintezei ADN-girazei: leziuni ale ADN bacterian, deoarece quinolonele sunt inductoare ale sistemului reparator SOS, dependent de Rec A.

Noile quinolone au reprezentat un real progres terapeutic având în vedere caracteristicile acțiunii lor antibacteriene (spectru larg, activitate bactericidă şi farmacocinetică). Aceasta explică spectaculoasa creştere a utilizării lor în ultimii 10 ani. Dar, utilizarea extensivă a noilor quinolone s-a tradus prin emergența îngrijorătoare a tulpinilor rezistente a unor specii bacteriene de mare importanță medicală (enterobacteriile, *Ps. aeruginosa, S. aureus, M. tuberculosis, N. gonorrhoeae*) şi a tulpinilor multirezistente la alte antibiotice.

Mecanismele rezistenței bacteriene la fluoroquinolone sunt de trei categorii:

- modificări ale enzimelor țintă ale medicamentelor;
- alterări care limitează accesul medicamentelor la țintă;
- activitatea pompelor de eflux.

Rezistența la quinolone este, predominant, consecința *modificărilor enzimei țintă*, la situsurile active ale enzimei.

BCU "VASILE GOLDIŞ" CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ADN giraza şi topoizomeraza IV sunt localizate în citoplasma bacteriană. Pentru a-şi atinge ţinta, antibioticele fluoroquinolonice trebuie să traverseze învelişul celular. Modificările structurale ale membranei externe a bacteriilor Gram negative asociate cu *diminuarea înglobării* sunt factori importanţi ai rezistenţei la fluoroquinolone. Variantele Gram negative rezistente la quinolone care se selectează, se datorează modificării porinelor din membrana externă, asociate cu scăderea permeabilităţii. Rezistenţa la quinolone nu este transferabilă prin intermediul plasmidelor. La bacteriile Gram pozitive, scăderea ratei înglobării nu s-a demonstrat a fi un mecanism al rezistenţei.

Atât bacteriile Gram pozitive, cât şi cele Gram negative pot dobândi un nivel scăzut al rezistenţei, mediat de activitatea *pompelor de eflux*, cu rol de transportori multipli, a căror activitate este dependentă de gradientul electrochimic (forţa proton motrice).

Nu s-au identificat enzime cu efect inactivator faţă de quinolone.

Ciprofloxacina are un potenţial antibacterian mult mai ridicat decât acidul nalidixic. Efectul bactericid al ciprofloxacinului este rapid, cu o pierdere de 90% a viabilităţii, într-un interval de 19 minute. Ciprofloxacina se foloseşte în tratamentul infecţiilor respiratorii, ale tractului urinar, gonoreii, pentru tratamentul infecţiilor diareice cu tulpinile enterotoxice de *E. coli*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella* sp. Este activă, de asemenea, faţă de *M. tuberculosis*. Este parţial metabolizată de ficat şi excretată de rinichi. Medicamentele antiacide (Maloox) blochează absorbţia ciprofloxacinei şi nu vor fi administrate concomitent. Administrată împreună cu teofilina, ciprofloxacina poate duce la acumularea unor niveluri sanguine înalte ale teofilinei. Ionii de Ca, Cu, Fe, Mn, Mg, Zn pot să lege ciprofloxacina şi diminuează mult absorbţia medicamentului.

Multe antibiotice, inclusiv ciprofloxacina, pot altera microbiota normală a colonului, favorizând dezvoltarea bacteriilor care produc inflamaţia mucoasei (colita pseudomembranoasă) şi determină tulburări diareice. Colita pseudomembranoasă se datorează creşterii în exces a bacteriei *Clostridium difficile* şi poate induce stări febrile, durere abdominală, tulburări ale tranzitului intestinal şi chiar starea de şoc. Tratamentul cu ciprofloxacină poate duce la creşterea în exces a levurii *Candida albicans*, cu localizare vaginală (vaginită) sau intestinală (disbioza).

Manifestarea efectelor secundare este prevenită prin administrarea probioticelor: *Lactobacillus casei, L. acidophilus, Bifidobacterium longum, Saccharomyces cerevisiae.*

Derivaţii quinolonici se folosesc pentru tratamentul infecţiilor căilor urinare, unde, după administrare orală, se acumulează în concentraţii inhibitorii. Fluoroquinolonele pătrund în ţesutul prostatic la concentraţii care echivalează sau depăşesc de câteva ori pe cele din plasmă.

Cele mai sensibile la acţiunea quinolonelor sunt enterobacteriile, dar compuşii grupului sunt activi faţă de chlamidii şi micobacterii.

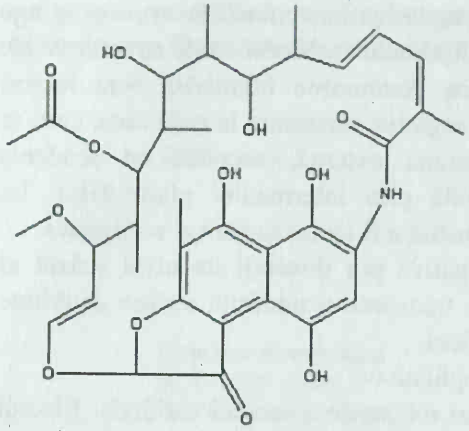
Quinolonele au efect antimicrobian prelungit după administrare, ceea ce se reflectă în continuarea supresiei creşterii bacteriene, după eliminarea agentului antimicrobian din organism. Dacă un medicament are un efect persistent după administrare, înseamnă că poate fi eficient chiar în intervalele dintre doze, când nivelul seric şi tisular au scăzut sub nivelul concentraţiei minime inhibitorii.

Quinolonele îşi păstrează activitatea faţă de multe bacterii rezistente la antibiotice, inclusiv faţă de bacilii Gram negativi cu rezistenţă multiplă, faţă de *S. aureus* rezistent la meticilină, faţă de *N. gonorrhoeae* rezistent la penicilină, faţă de *Haemophilus influenzae* producător de β-lactamaze.

Ciprofloxacina, ofloxacina şi tosufloxacina sunt active faţă de *Chlamydia trachomatis* şi *Mycoplasma hominis*. Quinolonele sunt de asemenea active faţă de *Rickettsia* spp.

Acidul nalidixic inhibă numai speciile de bacterii Gram negative aerobe. În molecula de ciprofloxacină, fluorul conferă activitate faţă de bacteriile Gram pozitive. Grupul piperazinic creşte activitatea faţă de enterobacterii, iar gruparea piperazină şi ciclopropil conferă activitate faţă de speciile de *Pseudomonas*.

BUCUREŞTI CAROL DAVILA UNIVERSITY OF MEDICINE AND PHARMACY LIBRARY

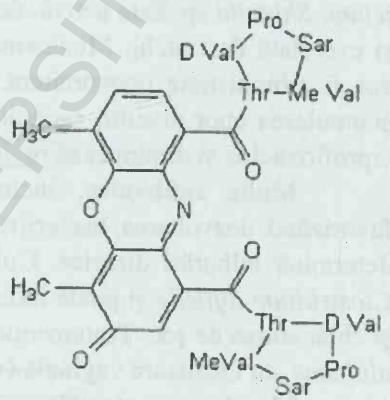


Structura moleculară a rifampicinei B

Rifampicina B este sintetizată natural, iar *rifampicina* este derivatul semisintetic cu cea mai largă utilizare clinică. Rifampicina este alcătuită dintr-o grupare cromoforă aromatică, inclusă într-o catenă alifatică. Ea se asociază cu subunitatea B a ARN-polimerazei dependente de ADN şi probabil chiar cu ADN în complexul de iniţiere, blocând astfel *iniţierea transcrierii* şi sinteza ARN. Antibioticul se foloseşte în terapia combinată a tuberculozei. Mutantele rezistente, cu subunitatea B a ARN-polimerazei modificată se selecţionează repede.

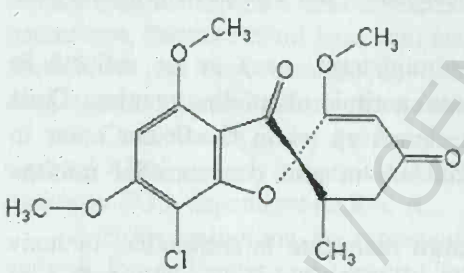
Actinomicina D (Dactinomicina) este formată dintr-o grupare cromoforă aromatică şi un ciclu peptidic. Ea interacţionează cu ADN şi *inhibă replicarea* şi *transcrierea.* Gruparea aromatică se intercalează în dublul helix al ADN, la perechile GC, iar peptidul ciclic rămâne la suprafaţă.

Novobiocina interferă cu sinteza ARN, deoarece inhibă ARN-polimeraza dependentă de ADN, iar *griseofulvina inhibă replicarea ADN*, consecutiv interferenţei cu polimerizarea nucleotidelor purinice. Cercetări recente sugerează că novobiocina acţionează asupra subunităţii B a ADN-girazei (topoizomeraza II) care produce şi menţine starea supraspiralizată a ADN.



Structura moleculară a actinomicinei D

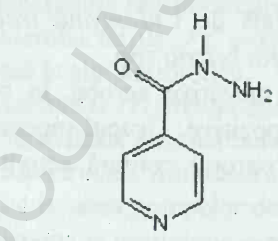
Griseofulvina sintetizată de *Penicillium griseofulvum* a fost izolată ca un factor care produce dezvoltarea anormală (răsucirea) a hifelor fungice. Se foloseşte pentru tratamentul infecţiilor fungice superficiale; inhibă creşterea fungilor micelieni, dar nu este activă faţă de bacterii sau levuri; nu influenţează creşterea fungilor cu pereţi celulozici, dar inhibă creşterea fungilor care conţin *chitină.* Griseofulvina influenţează celulele fungice prin contact direct: creşterea hifelor aeriene nu este modificată. Concentraţiile mici produc răsucirea hifelor, ramificarea extensivă, micşorarea distanţei dintre pereţii transversali, creşterea diametrului. La concentraţii mari de antibiotic, modificările de creştere se amplifică şi hifele se rup.



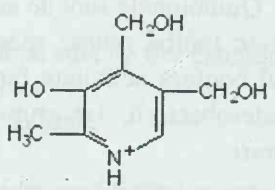
Structura moleculară a griseofulvinei

Antibioticele care interacţionează cu ADN produc efecte nediscriminatorii asupra ADN bacterian, viral sau al celulei eucariote.

Alţi agenţi chimioterapeutici de sinteză. Hidrazida acidului nicotinic (izoniazida, INH), introdusă în clinică înainte de 1950, împreună cu rifampina, formează baza chimioterapiei antituberculoase. Izoniazida este un derivat al nicotinamidei. Mecanismul de acţiune nu este cunoscut, dar influenţează sinteza lipidelor, acizilor nucleici şi acidului micolic la *M. tuberculosis.*



Structura moleculară a izoniazidei

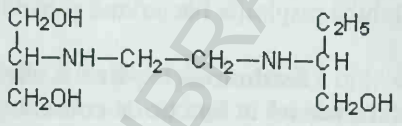


Structura moleculară a piridoxinei (vitamina B_6)

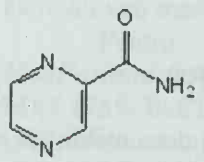
BCU IAŞI / CENTRUL DE INFORMARE BIBLIOTECARĂ

Se presupune că izoniazida este activă prin competiție cu *piridoxina* (vitamina B_6) necesară creşterii celulelor de *M. tuberculosis*, sau inhibă sinteza *acizilor micolici* (acizi graşi specifici acestor bacterii). Este bactericidă față de celulele care cresc şi se divid şi are acțiune bacteriostatică față de celulele care nu se multiplică. Toate cele trei (PASA, dapsone şi izoniazida) se folosesc pentru tratamentul infecțiilor cu *Mycobacterium*.

Etambutolul, pirazinamida şi *etionamida* blochează reacțiile enzimatice în celula bacteriană, deoarece sunt similare dar nu identice cu vitaminele bacteriene.

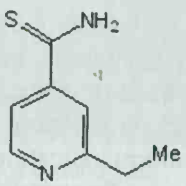

Structura moleculară a etambutolului

Etambutolul inhibă arabinozil-transferaza, enzimă implicată în biosinteza arabinogalactanului şi lipoarabinomananului. Alte efecte atribuite acțiunii etambutolului sunt inhibiția metabolismului ARN şi sintezei fosfolipidelor, inhibiția transferului acizilor micolici la arabinogalactanul legat de peretele celular mureinic, sinteza spermidinei şi inhibiția unei trepte timpurii a conversiei glucozei în monozaharidele utilizate pentru sinteza polizaharidelor parietale (arabinogalactan, arabinomanan) şi a peptidoglicanului. Este un medicament foarte specific şi eficient, utilizat în asociație cu izoniazida, pentru tratamentul tuberculozei. Are efect bacteriostatic. Nu se cunoaşte mecanismul care determină rezistența la etambutol (Musser, 1995).


Structura moleculară a pirazinamidei

Pirazinamida este un derivat sintetic al nicotinamidei. Nu se cunoaşte mecanismul de acțiune, nici baza moleculară a rezistenței. Unele tulpini sensibile la pirazinamidă au o enzimă specifică (pirazinamidaza), ce metabolizează pirazinamida la acidul *pirazinoic*, intermediarul activ antibacterian. Tulpinile rezistente la pirazinamidă au pierdut activitatea pirazinamidazică. S-au identificat şi tulpini foarte rezistente la pirazinamidă, care au şi activitate pirazinamidazică. Aceasta sugerează că, în plus față de pierderea capacității de sinteză a pirazinamidazei, există şi alte mecanisme de rezistență.

Etionamida, derivată a acidului izonicotinic, este activă față de *M. tuberculosis* şi alte micobacterii. *In vitro*, celulele de *M. tuberculosis* îşi pierd acidorezistența. Se crede că mecanismul său de acțiune implică *inhibiția sintezei acizilor micolici*.


Structura moleculară a etionamidei

Nu se cunosc mecanismele rezistenței la etionamidă şi la izoniazidă.

Metronidazolul a fost introdus în clinică în 1959 pentru tratamentul infecției cu *Trichomonas vaginalis*. Ulterior s-a demonstrat eficiența sa față de infecțiile cu bacterii anaerobe şi față de alte infecții parazitare. Difuzează bine în țesuturi, inclusiv în sistemul nervos. Are cea mai bună activitate bactericidă, dintre toate medicamentele active față de bacteriile anaerobe.

Acțiunea sa constă în *activarea reductivă* a grupăriii *nitro*. Metronidazolul acționează ca acceptor preferențial de electroni (e^-), fiind redus de proteinele transportoare de e^- cu potențial redox scăzut. Reducerea scade concentrația sa, ceea ce menține un gradient ce favorizează încorporarea medicamentului în celulă şi generarea produselor intermediare ale reducerii, cu efecte toxice pentru celulă. Toxicitatea se datorează compuşilor intermediari sau radicalilor liberi ce interacționează cu ADN şi probabil cu alte molecule, producând leziuni. Intermediarii citotoxici se descompun în produse finale netoxice şi inactive: acetamida şi acidul 2-hidroxietil oxamic. Efectul asupra microbiotei intestinale este minim, deoarece medicamentul este redus în condiții anaerobe.

Methenamina este produsul ciclic de condensare a formaldehidei şi amoniului. Are activitate antibacteriană slabă, dar la pH acid, fiecare moleculă hidrolizată generează 4 molecule de amoniu şi 6 molecule de formaldehidă:

$$(N_4CH)_6 + 6\,H_2O + 4\,H^+ \longrightarrow 4\,NH_4^+ + 6\,HCHO$$

Este excretată în urina acidă, unde este hidrolizată şi formaldehida eliberată este bactericidă. Este disponibilă ca sare a acidului mandelic sau hipuric pentru acidifierea urinii. Nu s-a descris rezistența la formaldehidă, dar tulpinile de *Proteus*, care produc frecvente infecții urinare sunt rezistente, deoarece ureaza lor clivează ureea la CO_2 şi NH_3 şi alcalinizează urina.

Derivații *nitrofuranului* (furazolidon, nitrofurantoina, nitrofuratel, nitrofurazon) au efect bacteriostatic față de bacteriile Gram pozitive și Gram negative. Cel mai utilizat este *nitrofurantoina*. Derivații nitrofuranului se folosesc pentru terapia infecțiilor tractului urinar, deoarece realizează concentrații suficient de mari în urină. Nu au acțiune sistemică. Un intermediar redus al nitrofuranilor produce ruperea catenei de ADN, ceea ce explică efectele mutagene ale acestor compuși *in vitro*. Sunt activate mecanismele de reparare a ADN. Metaboliții reactivi reduși ai nitrofurantoinei interferă nu numai cu ADN, ci par a fi capabili să se lege cu proteinele ribosomale și inhibă sinteza proteinelor. Inhibă respirația bacteriană și metabolismul piruvatului.

Evaluarea *in vitro* a eficienței unui antibiotic se realizează prin măsurarea a 3 parametri, care variază în funcție de concentrația antibioticului și de timpul său de acțiune:

- ✓ *concentrația minimă activă* (= **C.M.A.**) – este concentrația la care antibioticul poate induce anumite perturbări în activitatea metabolică a microorganismelor, fără a afecta capacitatea de multiplicare și viabilitatea acestora;
- ✓ *concentrație minimă inhibitorie* (= **C.M.I.**) – este concentrația la care un antibiotic inhibă multiplicarea microorganismelor (efect bacteriostatic);
- ✓ *concentrație minima bactericidă* (= **C.M.B.**) – este concentrația la care un antibiotic are acțiune letală asupra microorganismelor (efect bactericid).

Metode calitative de determinare a spectrului de sensibilitate la antibiotice

Metoda difuzimetrică (Kirby-Bauer)

Este o metodă foarte simplă și rapidă, care permite determinarea spectrului de sensibilitate a microorganismului la diferite antibiotice. Metoda are mai multe variante, în practică folosindu-se curent tehnica discurilor impregnate cu antibiotice, standardizată, recomandată de NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standardisation*), în prezent CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute).

O serie de factori, ca de exemplu, tulpina microbiană studiată (densitatea inoculului, specia, vârsta culturii), mediul de cultură (compoziția mediului, valoarea pH, densitatea și grosimea stratului de mediu), tehnica folosită și criteriile de interpretare a rezultatelor obținute, pot influența rezultatele unei antibiograme. Din acest motiv, tehnica trebuie efectuată în condiții standardizate, reproductibile, conform indicațiilor forurilor internaționale în domeniu.

Pe suprafața unui mediu agarizat însămânțat "în pânză" cu un inocul standardizat, obținut din tulpina de testat, se plasează la distanțe egale discuri impregnate cu soluții de antibiotice de o anumită concentrație care vor difuza în mediu, realizând un gradient de concentrație invers proporțional cu diametrul zonei de difuzie, deci cu distanța față de disc. Dacă tulpina este sensibilă la un anumit antibiotic, creșterea microbiană va fi inhibată pe o anumită suprafață în jurul discului impregnat cu antibioticul respectiv, suprafață denumită *zonă de inhibiție a creșterii*.

Citirea rezultatelor se realizează prin măsurarea diametrelor zonelor de inhibiție a creșterii determinate de diferite antibiotice, cu ajutorul unei *rigle gradate*. În cazuri de urgență clinică se poate realiza o primă citire la 6–8 h de la incubare. Interpretarea rezultatelor se face în funcție de dimensiunea zonelor de inhibiție a creșterii, exprimând rezultatul cu termenii de tulpină *sensibilă* (*S*), *rezistentă* (*R*) sau *intermediar sensibilă* (*I*), conform tabelelor cu puncte critice standardizate și corespunzătoare metodei de lucru: tabelele NCCLS pentru metoda difuzimetrică recomandată. Termenii S, I, R definesc de fapt și categoriile de antibiotice, în funcție de efectul lor clinic, după cum urmează:

- ❖ categoria **S**, înseamnă că există o mare probabilitate ca antibioticul, administrat în doze obișnuite, să elimine infecția determinată de tulpina testată (C.M.I. are valori net inferioare celor ale concentrațiilor umorale obținute în urma administrării unei doze obișnuite);
- ❖ categoria **I**, semnifică probabilitatea ca antibioticul să fie eficient *in vivo* prin administrare locală sau prin realizarea în mod fiziologic a concentrațiilor mari în organele sau țesuturile (rinichi, ficat, căi biliare), la nivelul cărora este localizat procesul infecțios;
- ❖ categoria **R** înseamnă că, cel mai probabil, administrarea antibioticului nu va determina eliminarea din organism a agentului infecțios a cărui sensibilitate a fost testată sau rezultatul tratamentului este imprevizibil;

BCU "VASILE GOLDIȘ" UNIVERSITY LIBRARY

❖ categoria NS (non-sensibilitate), raportată pentru antibioticele pentru care nu există puncte critice de separare între cele 3 categorii, S, I, R.

La citirea şi interpretarea rezultatelor se iau în considerare diametrele zonelor de inhibiţie, lipsite complet de colonii vizibile cu ochiul liber.

Apariţia coloniilor la marginea sau în interiorul zonei de inhibiţie se poate datora următorilor factori: cultura este mixtă sau suprainfectată; cultura este pură, dar prezintă celule heterorezistente; apariţia mutantelor rezistente; dezvoltarea tardivă a unor celule, de fapt sensibile, şi apariţia coloniilor după ce antibioticul s-a diluat prin difuzie în mediu.

Prepararea inoculului

Metoda în mediu lichid: se repică 3–5 colonii egale din placa de dipersie de 18–24 ore, se suspensă în 5 ml de mediu lichid (Brain-Heart, Todd Hewitt, Tripticase soia etc.) şi se incubează la 35°C timp de 2–6 ore, până la obţinerea unei turbidităţi de 0,5 pe scara Mac Farland – densitate optică la λ 550 nm, de 0,125. Dacă turbiditatea este superioară, cultura se diluează cu ser fiziologic steril.

Metoda suspensionarii directe a coloniilor: se repică un număr de colonii de pe placa cu cultură de 18 ore şi se suspensă în ser fiziologic steril, pentru obţinerea unei turbidităţi echivalente cu cea a etalonului 0.5 MacFarland – densitatea optică la λ 550 nm este 0,125 (fig. 369). Se agită cu ajutorul unui agitator vortex, timp de 15–20 secunde. Se calibrează suspensia prin adăugarea unei cantităţi mai mari sau mai mici de soluţie clorurată izotonică până la obţinerea densităţii optice dorite.

Pentru ***prepararea standardului MacFarland 0,5,*** se amestecă 0,5 ml $BaCl_2$ 0,048 M (1,175% $BaCl_2 + 2H_2O$), 99,5 ml H_2SO_4 0,18 M (1% v/v), se agită continuu şi se controlează absorbţia la 625 nm, care trebuie să fie 0,08–0,10. Se distribuie volume de 4–6 ml în tuburi cu dop filetat. Se păstrează la întuneric, la temperatura ambiantă.

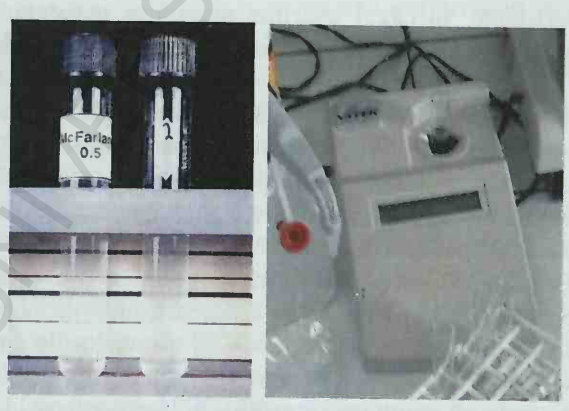


Fig. 369. Metoda nefelometrică (cu ajutorul standardului MacFarland) (stg.), respectiv densitometrică (dr.) de ajustare a densităţii inoculului microbian.

Inocularea plăcilor

Plăcile uscate sunt inoculate la cel mult 15 minute după prepararea inoculului. Se introduce un tampon steril în suspensia calibrată şi se retrage prin rotirea de mai multe ori, cu presiune contra peretelui tubului, pentru eliminarea excesului de lichid. Inocularea în plăcile cu agar Müller–Hinton se realizează prin tehnica însămânţării în pânză, prin rotirea plăcii cu câte 60°, căutând să obţinem o însămânţare uniformă (fig. 370).

În funcţie de specia testată, se vor alege antibioticele indicate de ultima ediţie a standardului CSLI, în care antibioticele sunt clasificate în mai multe categorii:

- *Grup A* – panelul de rutină;
- *Grup B* – antibiotice cu raportare selectivă (se testează atunci când tulpina izolată este R la antibioticele de clasa A, dacă pacientul este alergic la antibioticele din panelul de rutină sau nu tolerează antibioticele de clasă A, CGIII se testează pentru bacilii Gram negativi (BGN) izolaţi din LCR, trimetroprim sulfametoxazol (SXT) pentru tulpinile izolate din infecţii urinare, polimicrobiene, generalizate etc.);
- *Grup C* – antibiotice suplimentare/alternative (se testează pentru tulpinile R la antibioticele primare, cum sunt tulpinile nosocomiale care prezintă rate crescute de R, la pacienţii cu alergii, intoleranţă, cloramfenicolul pentru tulpinile de *Salmonella* extraintestinale etc.);
- *Grup O* – antibiotice care nu se testează în rutină, dar care sunt eficiente în infecţiile cu anumiţi agenţi patogeni;
- *Grup U* – nitrofurantoin, quinolone – se testează pentru tulpinile izolate din ITU;

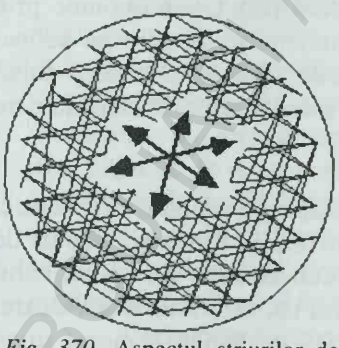


Fig. 370. Aspectul striurilor de însămânţare "în pânză", cu tamponul.

• *Inv* – antibiotice în curs de investigare, care nu sunt aprobate de FDA (*Food and Drug Administration*).

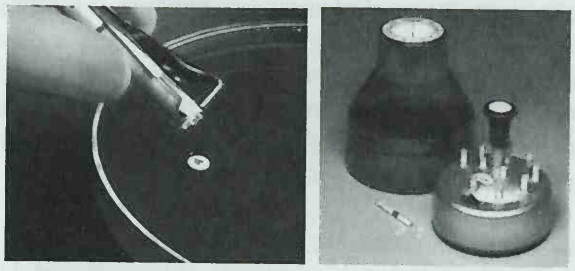


Fig. 371. Metode de depunere a discurilor de antibiotic pe placa cu mediu însămânțat (individual, cu ajutorul pensei sau simultan, cu ajutorul unui *dispenser*).

Discurile de antibiotic vor fi depuse cu ajutorul unor dispensere sau pense sterile, aplicându-se o presiune discretă pe discuri, pentru asigurarea contactului perfect cu suprafața agarului (fig. 371).

Discurile vor fi așezate la cel puțin 15 mm de marginea plăcii și distribuite în așa fel încât să nu existe suprapuneri între zonele de inhibiție.

După 15 minute de la depunerea disurilor, plăcile sunt introduse în termostatul de 35°C, răsturnate, cu mediul în partea superioară, în grupuri de maximum 5 plăci, și în aerobioză timp de 16–18 ore. În cazul stafilococilor sensibili la meticilină, incubarea se prelungește la 24 de ore pentru confirmarea absenței coloniilor rezistente la meticilină. După 18 ore (24 de ore în cazul testării sensibilității la meticilină și vancomicină) de incubare se măsoară cu o riglă diametrul zonelor de inhibiție, pe spatele plăcii. Citirea diametrului pentru meticilină se realizează cu ajutorul luminii transmise, pentru observarea coloniilor foarte mici, rezistente. În cazul apariției coloniilor rezistente în interiorul zonei de inhibiție, poate fi vorba de mutante rezistente, contaminare, populații heterogene sau culturi mixte.

Pentru controlul de calitate (CC) se utilizează tulpini standard pentru controlul reproductibilității și fiabilității metodologiei utilizate. Tulpinile standard pentru control se păstrează în congelator la –70°C pentru conservarea calităților și evitarea modificărilor genetice. Pentru reconstituire nu se decongelează, ci se scarifică suprafața tubului cu ansa sau cu tamponul și se însămânțează într-un mediu lichid. Se incubează la 35°C, timp de 18–20 ore, se realizează un nou pasaj și apoi se testează. Se utilizează tulpinile de control la fiecare lot nou de mediu sau de antibiotic. Tulpina *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 este folosită pentru detectarea nivelului inhibitorilor din mediul Müller–Hinton, în vederea testării trimetoprimului și/sau sulfametoxazolului. Tulpina ATCC 25923 este utilizată pentru CC al discurilor de antibiotice utilizate. Tulpina *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853 servește pentru CC al conținutului cationic și al valorii pH a mediului, care pot influența în special rezultatele testării la aminoglicozide. Diametrele obținute cu tulpinile standard sunt comparate cu cele specificate în tabelele CLSI.

Testarea cantitativă a activității antimicrobiene – determinarea unor parametri cantitativi ai acțiunii antimicrobiene (CMI)

Tehnica microdiluțiilor binare în mediu lichid

Se realizează în mediu lichid (bulion Müller Hinton), repartizat în placi cu 96 de godeuri, în vederea determinării concentrației minime inhibitorii CMI. În acest scop, se realizează diluții seriale binare ale soluției stoc de antibiotic într-un anumit volum de mediu, ulterior godeurile fiind însămânțate cu suspensie microbiană cu densitate 0.5 MacFarland (1:5). La fiecare testare se lucrează cu martor de cultură microbiană (godeuri care conțin exclusiv mediu de cultură inoculat cu suspensie microbiană) și cu martor de sterilitate a mediului (godeuri care conțin exclusiv mediu de cultură).

După incubarea placilor la 37°C timp de 24 de ore, se analizează rezultatele obținute prin observare macroscopică. Concentrația de antibiotic corespunzătoare ultimului tub în care nu se mai observă dezvoltarea culturii reprezintă valoarea C.M.I. (μg/ml). În tuburile următoare, inclusiv tubul martor de creștere, mediul se tulbură ca urmare a creșterii microbiene. Tubul martor de sterilitate nu prezinta cultură dezvoltată.

Metoda E-test (Epsilometer test)

Metoda E-test utilizează benzi impregnate cu diferite concentrații ale aceluiași antibiotic, înscrise pe banda respectivă. Zona de inhibiție a creșterii microorganismului testat are aspect de elipsă, a cărei suprafață variază direct proporțional cu gradientul de concentrație a antibioticului difuzat în mediu, diminuându-se odată cu scăderea concentrației astfel că, la o anumită valoare, zona de inhibiție a creșterii va intersecta banda, concentrația înscrisă pe bandă la acest nivel indicând valorea C.M.I. (fig. 372).

Teste fenotipice pentru detectarea mecanismelor de rezistență la antibiotice

Metoda discurilor duble

Aceasta metodă presupune compararea diametrelor zonelor de inhibiție date de un disc impregnat cu un antibiotic betalactamic (penicilină, cefalosporină sau carbapenem) cu un alt disc impregnat cu același antibiotic asociat cu un inhibitor de betalactamaze (acidul clavulanic pentru betalactamaze sensibile la inhibitori și respectiv chelatori de metale bivalente, de exemplu EDTA, pentru metalo-betalactamaze). Dacă tulpina testată produce o enzimă sensibilă la acești inhibitori, diametrul zonei este mai mare pentru discul ce conține antibiotic + inhibitor.

Fig. 372. E-test ESBL (deformarea elipsei în zona centrală a benzii, datorită sinergismului de acțiune dintre cefalosporină-cefepim, PM) și inhibitorul de β-lactamază-cefepim cu acid clavulanic, PML).

Testul dublei difuzii pentru detectarea ESBL

Pe o placă cu mediu Müller-Hinton inoculată cu tulpina de testat (cultură de 24 h, însămânțare pe placă prin tehnica „în pânză") se aplică discuri cu amoxicilină/clavulanat (AMC) și la 25–30 mm distanță se plasează discuri conținând cefalosporine (ceftazidim, cefotaxim).

Se incubează peste noapte la 37°C.

Producerea de ESBL este certificată dacă diametrul zonei de inhibiție este extins din cauza clavulanatului (inhibitorul de β-lactamaze) (fig. 373a).

Avantajul acestei metode simple este costul scăzut; dezavantajul este acela că alegerea optimă a discurilor poate varia cu fiecare tulpină. Izolatele cu ESBL de tip TEM și SHV dau rezultate pozitive, în schimb cele cu enzime de tip CTX-M dau un rezultat pozitiv numai atunci când cefotaximul sau cefpodoximul înlocuiesc ceftazidimul, ca indicator de cefalosporine.

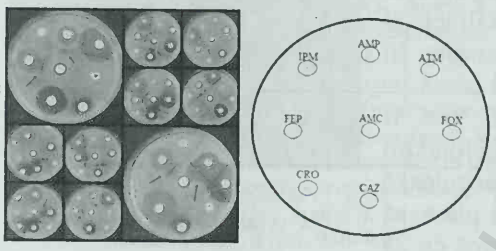


Fig. 373a. Fenotip ESBL, cu synergism între AMC și cefalosporină de generația a IV-a (cefepim)

Tulpinile producătoare de AmpC și majoritatea tulpinilor hiperproducătoare de enzime K1, dau rezultate negative, cu toate cele trei cefalosporine.

Se recomandă utilizarea discurilor de cloxacilină pentru detectarea penicilinazelor (acest antibiotic inhibă cefalosporinazele);

N.B. – inoculul dens poate masca hiperproducția de β-lactamaze;

N.B. – când sinergismul nu este vizibil din cauza fuzionării zonelor de inhibiție, se îndepărtează discurile (30 mm) sau se taie discurile de antibiotic în patru;

N.B. – existența unor discrepanțe mari între diametrul zonelor de inhibiție la CAZ și CTX se datorează prezenței unei alte enzime pe lângă ESBL (de exemplu β-lactamaze AmpC la *Enterobacter cloacae*).

Testul "treflei" sau Hodge modificat

Pune în evidență metaloß-lactomazele produse de bacilii Gram negativi non-fermentativi și de unele specii de enterobacterii. În acest scop, se însămânțează în pânză o tulpină de *K. pneumoniae* sau de *E. coli* sensibilă la carbapeneme. Se depune în centrul plăcii un disc de carbapenem (inipenem sau meropenem). Se însămânțează în striuri perpendiculare pe disc tulpinile de testat, posibil producătoare de metalo-ß-lactamaze. Apariția aspectului de treflă datorat inducerii zonei de inhibiție indică o tulpină producătoare de carbapenemază (în imagine, tulpinile B și D). Tulpinile sensibile nu determină modificarea aspectului circular al zonei de inhibiție a creșterii (tulpinile A și C) (Fig. 373b).

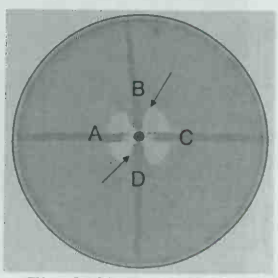


Fig. 373b. Testul Hodge (Arnold et. al., 2011).

Carbopenemazele pot fi evidențiate și prin E-Test (IMP/IMP+EDTA) sau prin adăugarea EDTA pe discul de IMP (creșterea zonei de inhibiție indică producerea de carbopenemază) (fig. 373c).

BUCUREȘTI CENTRALA UNIVERSITARĂ

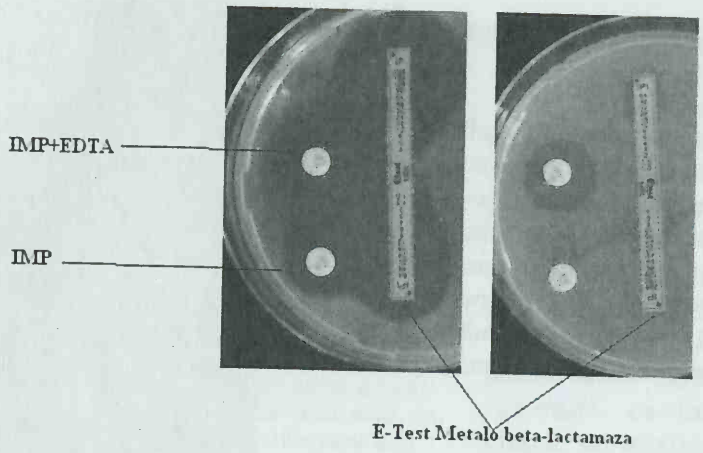


Fig. 373c. Evidențierea producerii de MBL prin disc difuziune sau E-TEST

***Teste pentru confirmarea prezenței unui mecanism de rezistență inductibil (β-lactamaze cromosomale inductibile* de tip AmpC sau fenotip MLSb inductibil)**

Cefalosporinele de generație I (ampicilina şi amoxicilina) induc exprimarea enzimelor tip AmpC şi sunt distruse de către acestea, la majoritatea speciilor de *Enterobacteriaceae*. Consecutiv, tulpinile bacteriene producătoare de β-lactamaze inductibile tip AmpC devin rezistente constitutiv. Unele tulpini aparținând speciilor producătoare de β-lactamaze inductibile tip AmpC sunt mutante derepresate care produc enzime AmpC fără inducție (derepresie stabilă). Aceste mutante sunt rezistente la aproape toate penicilinele şi cefalosporinele (Livermore şi colab., 2001) şi sunt frecvente în izolatele clnice (fig. 374).

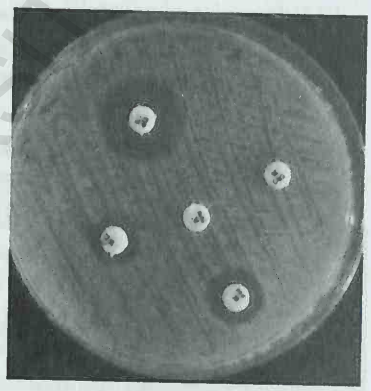


Fig. 374. Fenotip de rezistență la cefalosporine şi AMC.

Speciile producătoare de β-lactamaze tip AmpC pot fi recunoscute prin teste de antagonism între cefoxitin şi cefotaxim (Sanders şi colab. 1982). Pentru efectuarea acestui test se inoculează plăci, conform protocolului din metoda antibiogramei, şi se plasează discuri cu ceftazidim şi cefoxitin, pe aceeaşi placă, la o distanță de 25 mm. Inducția de β-lactamaze este evidențiată prin aplatizarea zonei de inhibiție a ceftazidimului în dreptul discului de cefoxitin. Astfel, cefoxitinul a determinat producerea de β-lactamaze inductibile care au hidrolizat ceftazidimul. Imipenemul este de asemenea inductor al cefalosporinazelor inductibile.

Acidul clavulanic este un inductor al β-lactamazelor tip AmpC şi de aceea apariția unor mici colonii în interiorul zonei de inhibiție a discului AMC poate fi un indicator util al prezenței enzimelor de tip AmpC.

Fenomenul de antagonism între discul de eritromicină şi clindamicină poate indica prezența mecanismului de rezistență inductibilă la lincosamide si streptogramine, prezent la stafilococi şi pneumococi (fig. 372).

Fig. 375. Fenotip de rezistență la macrolide (eritromicină E) şi sensibilitate la lincosamide (clindamicină CD) – stg; fenotip de rezistență MLSBi – dreapta.

Au fost concepute numeroase teste directe de detectare a activității β-lactamazice, dar numai o parte se pretează ca analize de rutină. Majoritatea folosesc cefalosporine cromogene, sau corelează hidroliza penicilinei cu o schimbare a culorii mediului de reacție, mediată de iod sau detectată cu un indicator de pH.

Testul la nitrocefin

Nitrocefinul este o cefalosporină care poate funcționa ca substrat cromogen pentru β-lactamaze și își schimbă culoarea de la galben la roșu atunci când este hidrolizat. Acesta reprezintă testul cel mai sensibil pentru majoritatea β-lactamazelor, exceptând penicilinazele stafilococice. Avantajul folosirii acestui antibiotic în testele de evidențiere constă în faptul că el este hidrolizat de toate β-lactamazele cunoscute, indiferent de specificitatea acestora.

Nitrocefinul este disponibil sub formă de pudră purificată de la Becton Dickinson (Oxford, UK) sau de discuri îmbibate cu antibiotic (OXOID).

Coloniile bacteriene sunt raclate de pe mediul nutritiv solid și resuspendate în tampon fosfat obținându-se o suspensie densă, peste care se adaugă soluție nitrocefin. Activitatea β-lactamazică este evidențiată prin apariția culorii roșii în 1–2 minute. În cazul enzimelor cu activitate mai mică răspunsul poate întârzia, însă rezultatele pozitive apărute la mai mult de 10 minute trebuie tratate cu scepticism întrucât ele pot fi cauzate de o activitate β-lactamazică secundară a proteinelor care leagă penicilina (*penicillin binding protein – PBP)* care formează complexe acil instabile (O'Callaghan și colab., 1972).

Bibliografie

1. Ackermann, G., Tang Y. J., Kueper R., Heisig P., Rodloff A. C., Silva J. Jr., and Cohen S. H. 2001. Resistance to moxifloxacin în toxigenic *Clostridium difficile* isolates is associated with mutations in *gyrA*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45:2348–2353.
2. Arnold R. S., Thom N. D., Sharma S., Phillips N., Jolinson J. K., Morgan D. J., 2011. Emergence of K. pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. South.Med.J. 104(1): 40-45.
3. Barry A. L., Jones R. N., Thornsberry C. 1981. Cefsulodin: antibacterial activity and tentative interpretive zone standards for the disk susceptibility test, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 20(4): 525–529.
4. Brooks G. F., Caroll K. C., Butel J.S., Morse S.A. eds. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition http:// www.accessmedicine.com
5. Bush K., Jacoby G. A., Medeiros A. A. 1995 A functional classification scheme for β-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 39:1211–1233
6. Chopra I., Roberts M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 65(2): 232–260.
7. Courvalin P. 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. Clin. Infect. Dis. 42(Suppl 1):S25–34.
8. Drlica K. 1999. Refining the fluoroquinolones. ASM. 65(6) 410-415.
9. Georgopapadakou N. H., Smith S. A., Sykes R. B. 1982. .Mode of action of azthreonam, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 21(6): 950–956.
10. Brooks G. F., Caroll K. C., Butel J. S., Morse S. A. eds. 2007. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 24th Edition Jawetz, Melnick și Adelberg. http:// www.accessmedicine.com
11. Livermore D. M. 1995. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clinical Microbiology Reviews. 8: 557–584.
12. Mihăescu G., Chifiriuc M. C., Dițu L. M. 2008. Antibiotice și substanțe chimioterapeutice antimicrobiene. Ed. Acad. Române, București ISBN 978-973-27-1573-4
13. Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. 1999. Aminoglycosides: Activity and Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 43: 727–37.
14. Musser J. M. 1995. Antimicrobial agents resistance in mycobacteria: molecular genetic insights, Clinical Microbiology Reviews. 1995, 8: 496–514.
15. O' Callaghan C. H., Morris A., Kirby S. M., Shingler A. H. 1972. Novel method for detection of P-lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1:283–288.
16. Sanders C. C., Sanders W. E. Jr. 1986. Type I beta-lactamases of Gram negative bacteria: interactions with beta-lactam antibiotics. J Infect. Dis. 154 :792–800
17. Shaw K. J., Rather P. N., Hare R. S., et al. 1993. Molecular Genetics of Aminoglycoside Resistance Genes and Familial Relationships of the Aminoglycoside-Modifying Enzymes. Microbiological Reviews 57:138–63.
18. Speer B. S., Shoemaker N. B., Salyers A. A. 1992. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance, Clinical Microbiology Reviews. 5(4): 387–399.
19. Taylor D. E., Courvalin P. 1988. Mechanisms of antibiotic resistance in Campylobacter species, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1988, 32(8): 1107–1112.
20. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Vol. I, II, Ed. Lesslie Collier, A. Balows, M. Sussman. 1998.
21. Vakulenko S. B., Donabedian S. M., Voskresenskiy A. M., Zervos M. J., Lerner S. A.,Chow J. W. 2003. Multiplex PCR for Detection of Aminoglycoside Resistance Genes in Enterococci, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 47(4): 1423–1426.
22. Vakulenko S. B., Mobashery S. 2003. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future, Clinical Microbiology Reviews. 16(3): 430–450.
23. Vester B., Douthwaite S. 2001. Macrolide Resistance Conferred by Base Substitutions in 23S rRNA, Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45(1): 1–12.
24. Wistreich A. G., Microbiology Laboratory Fundamentals and Applications (Hardcover), 1996.
25. Wolfson J. S., Hooper D. C. 1989. Fluoroquinolone antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev.2: 378

Tiparul s-a executat sub c-da nr. 3667/2015 (cont. tiraj)
la Tipografia Editurii Universității din Bucureşti

Biblioteca Centrală Universitară
BIBLIOTECA DE BIOLOGIE
Cota veche 115
Prețul lei

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ISBN 978-606-16-0600-9

Lewi 115.0